



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DO SOLO EM POPULAÇÕES
NATIVAS DE *Vochysia bifalcata* Warm. NO ESPÍRITO SANTO**

Larissa Souza Vianna

ALEGRE-ES

Fevereiro/2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DO SOLO EM POPULAÇÕES
NATIVAS DE *Vochysia bifalcata* Warm. NO ESPÍRITO SANTO**

Larissa Souza Vianna

ORIENTADOR: Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira

COORIENTADOR: Dr. Fábio Demolinari de Miranda

ALEGRE-ES

Fevereiro/2015

LARISSA SOUZA VIANNA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento da
Universidade Federal do Espírito
Santo – Centro de Ciências Agrárias
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Melhoramento.

Orientador: Dr. Marcos Vinicius
Winckler Caldeira.

Coorientador: Dr. Fábio Demolinari
de Miranda.

ALEGRE-ES

Fevereiro/2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Vianna, Larissa Souza, 1986-
V617c Caracterização genética e do solo em populações nativas de
Vochysi bifalcata warm. no Espírito Santo / Larissa Souza Vianna. –
2015.
91 f. : il.

Orientador: Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

Coorientadores: Fábio Demolinari de Miranda.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Diversidade genética. 2. Solos – Fertilidade. 3. Floresta Ombrófila
Densa Montana. 4. Marcadores moleculares. I. Caldeira, Marcos
Vinicius Winckler. II. Miranda, Fábio Demolinari. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias.
IV. Título.

CDU: 575:631.52

Larissa Souza Vianna

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DO SOLO EM POPULAÇÕES
NATIVAS DE *Vochysia bifalcata* Warm. NO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada: 26 de fevereiro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador



Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda

Universidade Federal do Espírito Santo

Coorientador



Prof. Dra. Sustanis Horn Kunz

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro externo

***““A mente que se abre a
uma nova ideia jamais
volta ao seu tamanho
original””.***

- Albert Einstein-

AGRADECIMENTO

A Deus, por razões que considero indescritíveis, por me manter equilibrada em mais este desafio que a vida me brindou.

Ao meu pai Manoel e minha mãe Nilza, por todo amor, pela educação que me deram, pelo apoio aos meus estudos e por crer em mim, sempre.

Ao meu namorado Philipe, por todo o apoio e amor, compreensão e ajuda em todos os momentos.

Ao meu professor e orientador Dr. Marcos Vinicius, que mesmo sem me conhecer aceitou comigo o desafio de estudar Genética e Melhoramento e empolgou a cada novidade.

Ao meu coorientador, professor Dr. Fábio Demolinari, possuidor de um admirável espírito humano e científico, pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação e paciência da qual sempre teve comigo. E, principalmente porque fez com que esse trabalho se concretizasse.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Arícia, Livia, Zé Dias, Alécia, Ugo, Ronald, Cássio, Franciele, Rodrigo e Edison pelos ensinamentos durante a vivência no Laboratório, pelas sugestões e ouvidos.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Sabrina, pela presteza dispensada durante o curso.

Ao técnico do laboratório de Recurso Hídricos do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira/CCA-UFES, Alexandro, pelo auxílio na execução das análises de solo.

Aos membros da banca pela gentileza em aceitar o convite e contribuir tão grandiosamente para minha formação e aperfeiçoamento.

Aos amigos Alessandra, Daniela, Danilo e Thábata, pelo incentivo ao meu ingresso no mestrado e pela fidelidade na amizade.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação a Biodiversidade (ICMBio) e à administração do Parque Nacional do Caparaó por ter disponibilizado a autorização para a realização desta pesquisa nos domínios do parque.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela sólida formação acadêmica.

À todos os professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelo ensino de alta qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para este estudo através do Projeto Universal CNPq nº 475471/2011-3, intitulado Diversidade Biológica e Funcional da Floresta Ombrófila Densa do Parque Nacional do Caparaó, Espírito Santo.

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização e finalização desta pesquisa, minha sincera gratidão.

RESUMO

Vochysia bifalcata é conhecida popularmente como Guaricica, é uma espécie arbórea neotropical cuja sobrevivência encontra-se ameaçada devido aos processos de degradação de seus ambientes naturais e exploração antrópica, considerado o estado de ameaça em que se encontram, faz-se necessário obter informações mais detalhadas sobre a diversidade genética de populações naturais desta espécie, o que é possível a partir de estudos com marcadores microssatélites. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética da espécie *Vochysia bifalcata* em duas populações nativas estabelecidas no Parque Nacional do Caparaó, ES, bem como, caracterizar a fertilidade do solo. Para tanto, foram coletadas amostras foliares de 28 indivíduos adultos em ambas populações, os testes de transferibilidade foram realizados utilizando 8 *primers* microssatélites desenvolvidos para *Qualea grandiflora* e 10 desenvolvidos para *Vochysia ferrugínea* no genoma dos indivíduos de *Vochysia bifalcata*. Os marcadores que geraram amplificações satisfatórias foram utilizados para os estudos de diversidade e estrutura genética em todos os 28 indivíduos amostrados. Para a caracterização dos atributos químicos do solo, foram selecionados aleatoriamente seis pontos de amostragem de solos em cada população, nas camadas de 0 – 5; 5 – 10 e 10 – 20 cm. Os resultados de amplificação heteróloga de *Vochysia ferrugínea* para *V. bifalcata* foram satisfatórios, sendo utilizados para as análises estatísticas e de *Qualea grandiflora* para *V. bifalcata* foram satisfatórios, entretanto se mostraram monomórficos. Para os iniciadores de *V. ferrugínea* os resultados mostraram a ocorrência média de 4,85 alelos/loco. Dois dos sete locos analisados evidenciaram a presença de alelos nulos, com frequência significativa. Os valores de riqueza alélica foram similares entre as duas populações. O valor médio de heterozigosidade observada para a população I foi 0,434 e para população II foi 0,355, ambos distintos do esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O índice de fixação médio para a população I foi de 0,390 e para a população II de 0,328, indicando presença de endogamia nas populações. O valor médio do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi de 0,608 para a população I e 0,566 para a população II, sendo considerados altamente informativos. O par de genótipos (9 e 11) e (5 e 9) foram identificados como os menos dissimilares na população I e população II, respectivamente. O valor de G_{ST} (0,079), indicou uma diferenciação genética moderada entre as populações. Para AMOVA,

92,86% da variação foram dentro de populações e 7,13% entre populações. Com a análise bayesiana foi possível definir a divisão dos genótipos em dois grupos. O fluxo gênico médio obtido foi de 2,88 sendo considerado alto o suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética. Os parâmetros genéticos obtidos geraram informações sobre a variabilidade genética existente, comprovando a importância do Parque Nacional do Caparaó para fins conservacionistas. As amostras de solos analisadas evidenciaram que a fertilidade de ambas populações apresenta-se baixas e com uma acidez elevada.

Palavras chave: Diversidade genética; Fertilidade do solo; Floresta Ombrófila Densa Montana; Marcadores moleculares.

ABSTRACT

Vochysia bifalcata is popularly known as Guaricica, is a tree neotropical species whose survival is threatened due to degradation processes of the natural environment and man operation, considered the threat of state they are in, it is necessary to obtain more detailed information the genetic diversity of natural populations of this species, which is possible from studies with microsatellite markers. In this context, the present study was to evaluate the genetic diversity of *Vochysia bifalcata* species and characterize soil fertility in two native populations established in Caparaó National Park, ES. Therefore, leaf samples from 28 adult individuals were collected from two native populations of *V. bifalta*. For transferability test were tested 8 microsatellite primers developed for *Qualea grandiflora* and 10 designed to *Vochysia ferruginea* in the genome of individuals to *V. bifalcata*. Total genomic DNA was isolated using the Doyle & Doyle protocol (1990) modified. The amplified fragments were separated by electrophoresis on gel polyacrylamide 10% with 1X TBE buffer. Electrophoresis was performed at constant voltage of 100 W for 5 hours. The markers that generate satisfactory amplifications were then used for the studies and genetic diversity of structure in all 28 individuals sampled. We randomly selected six soil sampling points in each population at depths 0-5; 5-10 e 10-20 cm and chemical analyzes were performed using the methodology proposed by EMBRAPA (1997). The heterologous amplification results for *V. ferruginea* to *V. bifalcata* were satisfactory, and then used for statistical analysis and *Q. grandiflora* for *V. bifalcata* were satisfactory, however proved to be monomorphic. For starters, *V. ferruginea* the results showed the average occurrence of 4.85 alleles/locus. In both two populations of seven loci analyzed suggested the presence of null alleles, with significant frequency. The allelic richness were similar between the two populations. The average observed heterozygosity for the population I was 0.434 and population II was 0.355, both distinct from the expected to the Hardy-Weinberg equilibrium. The average fixation index for the population I was 0.390 and the population II was 0.328, indicating the presence of inbreeding within populations. The average value of Polymorphic Information Content (PIC) was 0.608 for the population I and 0.566 for the population II and are considered highly informative. The pair of genotypes (9 and 11) and (5 and 9) were identified as the least dissimilar opulations the population I and II, respectively. The amount of G_{ST} (0.079) indicated a moderate genetic differentiation among populations. To AMOVA, 92.86% of the variation was within

populations and among populations 7.13%. After analyzing the program, STRUCTURE was possible to define the division into two groups of genotypes. The obtained average gene flow was 2.88 being considered high enough to counteract the effects of genetic drift. These data generate important information about the genetic variability, proving the importance of Caparaó National Park for the species conservation. Soil samples analyzed demonstrated that the fertility of both populations are present and a low acidity, the homogeneity of the soil fertility can be explained by the soil and climatic characteristics similar between the two study populations.

Keywords: Genetic diversity; Soil fertility; Rain Forest Montana; molecular markers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA VOCHYSIACEAE E DO GÊNERO VOCHYSIA.....	19
2.2	IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE <i>VOCHYSIA BIFALCATA</i>	23
2.3	FERTILIDADE DOS SOLOS FLORESTAIS	26
2.4	EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS	29
2.5	MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) E AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA.....	31
3	OBJETIVO	35
3.1	OBJETIVOS GERAIS	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	36
4.2	ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	38
4.2.1	IDENTIFICAÇÃO E AMOSTRAGEM DOS INDIVÍDUOS DE <i>V. BIFALCATA</i>	38
4.2.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	40
4.2.4	TESTE DE AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA	41
4.2.5	ANÁLISES DOS DADOS MOLECULARES	45
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO	46
4.3.1	COLETA E ANÁLISE DE SOLO	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CARACTERIZAÇÕES DENDROMÉTRICAS.....	47

5.2 ESTUDO DE AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA.....	48
5.3 ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL.....	53
5.4 ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL.....	59
5.5 ATRIBUTOS QUÍMICOS DOS SOLOS.....	63
6 CONCLUSÃO	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE 1.....	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Diagramas florais dos 8 gêneros de Vochysiaceae. A numeração das sépalas segue a ordem cronológica na ontogenia dessas estruturas. Fonte: LITT & STEVENSON (2003)..20
- Figura 2 -** Distribuição geográfica anfiatlântica de Vochysiaceae. Fonte: SYTSMA et al. (2004).21
- Figura 3 -** Relações entre os visitantes e as flores dos gêneros da tribo Vochysieae. Setas grossas indicam polinizadores principais e setas finas polinizadores secundários e visitantes oportunistas. Modificado e adaptado de OLIVEIRA (1998) e GOTTSBERGER & SILBERBAUER-GOTTSBERGER (2006). 22
- Figura 4 -** (A) Indivíduo de *V. bifalcata* – Fonte: Fábio Demolinari de Miranda, 2013. (B) Flores de *V. bifalcata*; (C) Exsicata de *V. bifalcata*. Fonte (B e C): Herbarium Catalogue, 2014.....24
- Figura 5 -** Localização do Parque Nacional do Caparaó, com destaque para o local de estudos das populações nativas de *V. bifalcata* dentro do Parque. **Fonte:** Mateus Lima Rosa. 36
- Figura 6 -** Localização geográfica dos dois locais de coletas de *V. bifalcata* estudadas. **Fonte:** Mateus Lima Rosa..... 38
- Figura 7-** Resultado do dendrograma dos 15 indivíduos da população I, pelo método de agrupamento UPGMA. A linha vertical representa o ponto de corte em aproximadamente 74,65% considerando a distância de ligação média. **Fonte:** Autora.....58
- Figura 8-** Resultado do dendrograma dos 13 indivíduos da população II, pelo método de agrupamento UPGMA. A linha vertical representa o ponto de corte em aproximadamente 65,53% considerando a distância de ligação média. **Fonte:** Autora.....59
- Figura 9-** Valores de ΔK para cada valor de K, calculado de acordo com Evanno et al. (2005). O maior valor de K corresponde ao K ótimo. **Fonte:** Autora.....61
- Figura 10-** Análise Bayesiana de 28 indivíduos de *V. bifalcata* ocorrentes em duas populações nativas do Parque Nacional do Caparaó, baseada em sete locos de microssatélites. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a proporção do genoma compartilhado com cada grupo; (1):pop I e (2) popo II. **Fonte:** Autora.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Populações amostradas no Parque Nacional do Caparaó.	39
Tabela 2 - Locos microssatélites utilizados para os testes de amplificação cruzada, incluindo nome da espécie para a qual o marcador foi originalmente desenvolvido, em que Q= <i>Qualea grandiflora</i> , nome no locus, sequência do par de <i>primers</i> e número de acesso no GenBank, motivo da repetição microssatélite.	41
Tabela 3 - Locos microssatélites utilizados para os testes de amplificação cruzada, incluindo nome da espécie para a qual o marcador foi originalmente desenvolvido, em que V= <i>Vochysia ferrugínea</i> , nome no locus, sequência do par de <i>primers</i> e número de acesso no GenBank, motivo da repetição microssatélite	42
Tabela 4 - Temperatura de anelamento (T_A) específica para cada um dos pares de <i>primers</i> testados, em que Q= <i>Qualea grandiflora</i> e V= <i>Vochysia ferruginea</i> de acordo com trabalhos desenvolvidos por Ritter et al. (2012) e Lowe et al. (2002), respectivamente.	43
Tabela 5 - Temperatura de anelamento (T_A) específica para cada um dos pares de <i>primers</i> testados de acordo com trabalhos desenvolvidos por e Ritter et al. (2012); Lowe et al. (2002) e trabalho original, em que Q= <i>Qualea grandiflora</i> e V= <i>Vochysia ferruginea</i> nome no locus.	49
Tabela 6 - Resultados das amplificações e parâmetros genéticos dos marcadores microssatélites do trabalho de origem e do presente estudo. A= Número de alelos por loco, FAN= Frequência de alelos nulos.	53
Tabela 7 - Resultados dos parâmetros genéticos dos 7 marcadores microssatélites. RS= Riqueza alélica, Ho=Heterozigosidade observada, He= Heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy Weinberg.	54
Tabela 8 - Comparação das características de locos microssatélites isolados para espécies arbóreas. A: média de alelos por loco, Ho: Heterozigosidade média observada, He: Heterozigosidade média esperada e respectivos autores.	56

Tabela 9- Resultados dos parâmetros genéticos dos 7 marcadores microssatélites. F= Índice de Fixação e PIC= Conteúdo Médio de Informação Polimórfico.57

Tabela 10 - Teores dos atributos químicos do solo coletados de duas populações nativas de *V. bifalcata* na Floresta Ombrófila Densa no Parque Nacional do Caparaó, ES, nas profundidades 0-5, 5-10 e 10-20 cm localizadas no PARNA.64

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é um bioma de importância global, constituída por um conjunto de formações florestais e outros tipos de vegetação. Em sua extensão original, ocupava continuamente cerca de 130 milhões de hectares que foram reduzidos a um mosaico de fragmentos representando aproximadamente 11,7% da formação original (RIBEIRO et al., 2009).

A fragmentação de habitat possivelmente acarreta consequências genéticas nas espécies, o que levou aos pesquisadores a questionarem a fragilidade genética de populações que sofreram este processo de fragmentação. Portanto, é necessário obter informações mais detalhadas sobre a diversidade genética de populações naturais (RITTER et al., 2012).

Conhecer a estrutura genética de uma espécie é muito importante para desenvolver estratégias de preservação das mesmas, o primeiro passo é conhecer a forma da qual essa diversidade encontra-se distribuída dentro e entre populações naturais. (CAVALLARI et al., 2006). Entender essa variação genética dentro das populações é essencial para a ação de conservação (BARBARÁ et al., 2007), por fornecer informações sobre o fluxo gênico entre as populações, divergência genética e sucesso reprodutivo (DÁRIO & ALMEIDA, 2000).

Considerado os aspectos de relevância ecológicos e econômicos da espécie *Voclysia bifalcata* Warm., bem como o estado de ameaça em que se encontram as populações naturais desta espécie, fazem-se necessários estudos que subsidiem estratégias de conservação e uso sustentável (LORENZI, 1998; CARVALHO, 2008).

Uma ferramenta útil e eficiente para estabelecer estratégias de conservação são os marcadores microssatélites (*Single Sequence Repeats* - SSR). Os microssatélites são baseados na amplificação de fragmentos distribuídos no genoma entre regiões repetitivas do DNA, são codominantes e permitem acessar elevados níveis de polimorfismo genético. Estudos de caracterizações moleculares têm sido largamente realizados em espécies arbóreas com marcadores do tipo microssatélites (DOW et al., 1995; BRONDANI et al., 1998; RAPOSO et al., 2007).

Por serem espécie-específicos, desenvolver marcadores SSR é um processo custoso e lento. No entanto, a proximidade evolutiva entre duas espécies permite que os pares de

iniciadores SSR sejam utilizados com sucesso em espécies pertencentes ao mesmo gênero ou gêneros relacionados, sendo este processo denominado amplificação heteróloga ou cruzada (COSTA, 2010).

A partir desta metodologia de transferibilidade, é possível desenvolver estudos de estrutura e diversidade genética em espécies que, até então, não possuíam microsatélites desenvolvidos especificamente para elas, como por exemplo, *Vochysia bifalcata* Warm., espécie foco do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA VOCHYSIACEAE E DO GÊNERO VOCHYSIA

A família Vochysiaceae está incluída no clado Myrtales (APG III, 2009), e compreende 250 espécies distribuídas em oito gêneros, mais da metade subordinado ao gênero *Vochysia*. Geralmente são árvores, com folhas simples, de filotaxia oposta ou verticilada, as flores são zigomorfas, isoladas ou em inflorescência do tipo tirso. O cálice é geralmente calcarado, a corola pode apresentar-se com número reduzido de pétalas e um único estame fértil (SHIMIZU, 2009).

Vochysiaceae é dividida tradicionalmente em duas tribos: Vochysieae Dumort. e Erismeeae Dumort. (Figura 1). Vochysieae é caracterizada por ovário súpero e trilocular, compreendendo cinco gêneros: *Callisthene* Mart., *Qualea* Aubl., *Ruizterania* Marc.-Berti, *Salvertia* A. St.-Hil. e *Vochysia* Aubl.. Já Erismeeae é caracterizada por ovário ínfero e unilocular e é composta por três gêneros: *Erisma* Rudge, *Erismadelphus* Mildbr. e *Korupodendron* Litt & Cheek. (SHIMIZU, 2009).

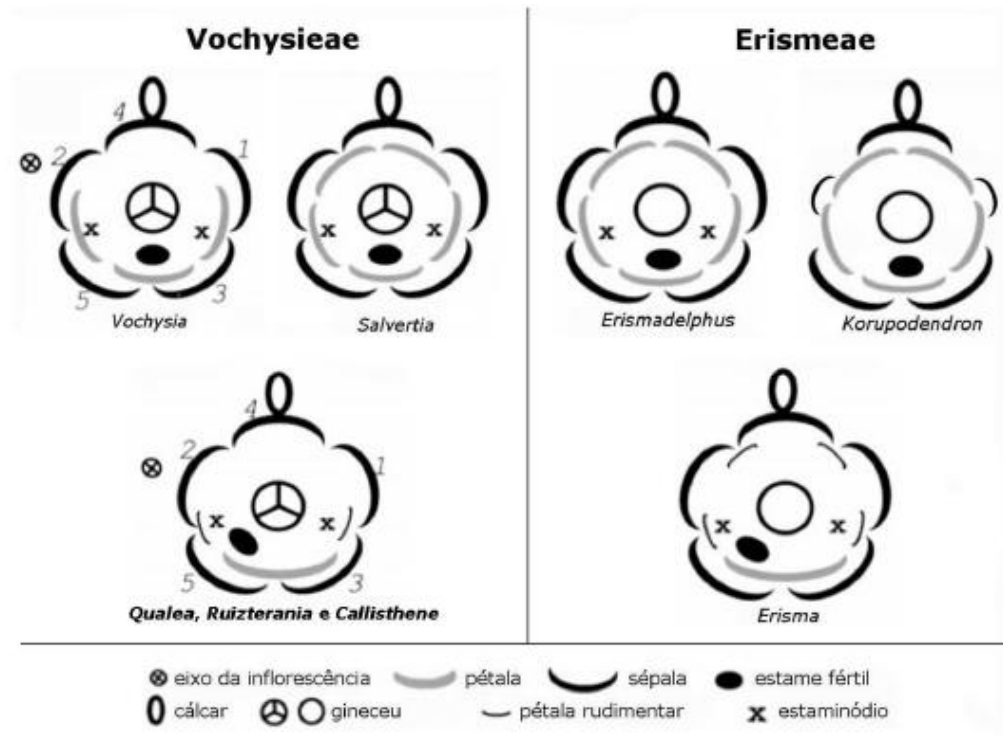


Figura 1- Diagramas florais dos 8 gêneros de Vochysiaceae. A numeração das sépalas segue a ordem cronológica na ontogenia dessas estruturas. **Fonte:** LITT & STEVENSON (2003).

A distribuição desta família é anfiatlântica (Figura 2), mas predominantemente Neotropical, onde ocorrem seis dos oito gêneros, sendo apenas *Erismadelphus* e *Korupodendron* exclusivos do oeste e centro da África (KEAY & STAFLEU, 1953; LITT & CHEEK, 2002; SENTERRE & OBIANG, 2005).

No continente americano, a família se distribui no México, América Central, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (MARCANO-BERTI, 2005), ocorrendo em florestas tropicais e savanas, principalmente no Brasil (KAWASAKI, 1998). O padrão de distribuição anfiatlântico confere à família um grande interesse fitogeográfico, pois permite entender sua estrutura e diversidade genética (AXELROD, 1970; THORNE, 1972).

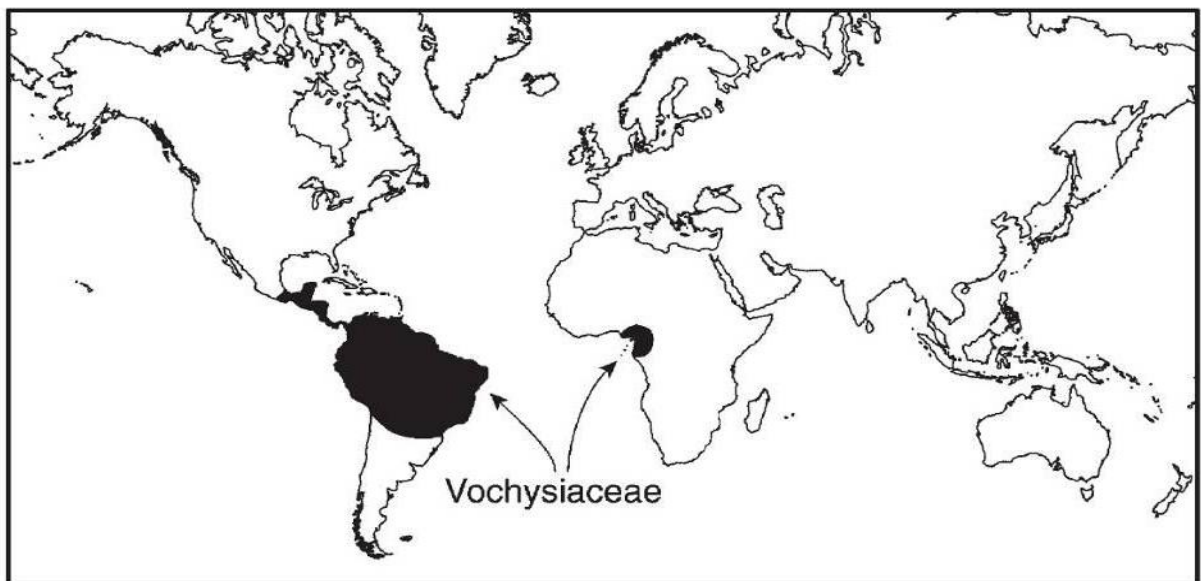


Figura 2 - Distribuição geográfica anfiatlântica de Vochysiaceae. **Fonte:** SYTSMA et al. (2004).

A família Vochysiaceae é bem representada na flora brasileira, onde ocorrem seis dos oitos gêneros, com aproximadamente 160 espécies (SOUZA & LORENZIN, 2012). Sua distribuição geográfica abrange praticamente todo território brasileiro, exceto Sergipe, Paraíba e Rio Grande do Norte (FRANÇA, 2014).

Estudos sobre a biologia reprodutiva de algumas espécies foram realizados (Figura 3), sendo a maioria melitófila. *Callisthene* é polinizada por abelhas pequenas, enquanto espécies de *Qualea* e *Vochysia* polinizadas por beija-flores e, principalmente, por abelhas grandes. Em *Qualea grandiflora* Mart. e *Salvertia convallariodora* A.St.-Hil. a polinização é do tipo esfingófila, ou seja, realizada por esfingídeos (OLIVEIRA, 1998).

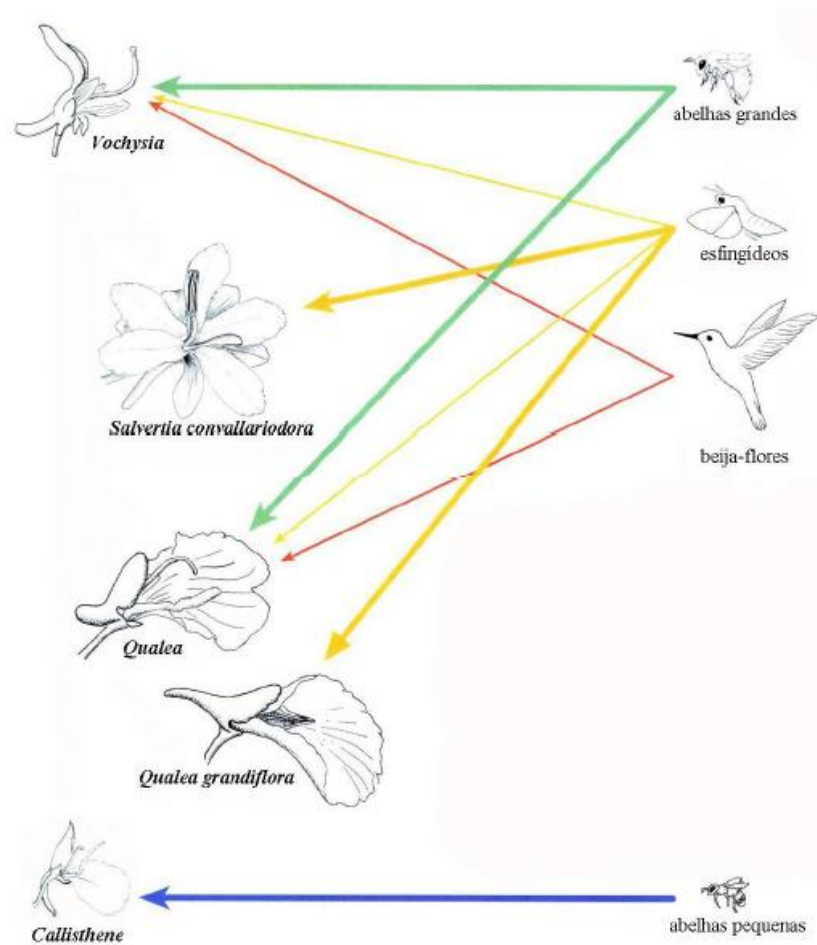


Figura 3 - Relações entre os visitantes e as flores dos gêneros da tribo Vochysieae. Setas grossas indicam polinizadores principais e setas finas polinizadores secundários e visitantes oportunistas. **Fonte:** Modificado e adaptado de OLIVEIRA (1998) e GOTTSBERGER & SILBERBAUER-GOTTSBERGER (2006).

O gênero *Vochysia* foi descrito por Aublet (1775), com a grafia inicial *Vochy*, tendo como espécie-tipo *Vochy guianensis* Aubl. O nome genérico sofreu latinizações posteriores, mas a última e aceita até hoje é *Vochysia*, proposta por Poiret em 1808 (STAFLEU, 1948).

Vochysia é um gênero neotropical com aproximadamente 143 espécies, distribuídas em uma área contínua que abrange a América Central e América do Sul, ocupa preferencialmente regiões de floresta tropical, subtropical e savanas. No Brasil, esse gênero possui cerca de 86 espécies com distribuição nos biomas florestais pluviais - Floresta Amazônica e Floresta Atlântica - assim como nos Cerrados ou Savanas, sendo considerados como os três maiores centros de diversidade do gênero. Das 86 espécies, 69 são endêmicas do Brasil (VIANNA, 1980).

As espécies deste gênero podem ser árvores, arbustos ou subarbustos com ramos de casca descamante em placas ou não. As folhas são opostas ou verticiladas e as inflorescências tirso terminais, terminais e subterminais ou axilares. As flores apresentam características muito peculiares, apresentando três pétalas, amarelas e desiguais, sendo a central maior; estame subséssil, situado no plano de simetria, caduco na antese; dois óvulos por lóculo; estigma terminal, subterminal ou lateral. O fruto é do tipo cápsula com deiscência simultânea (não basípeta) ao longo da linha de abertura no meio do lóculo, valvas fundidas ao centro do fruto em praticamente toda a extensão, exocarpo unido ao endocarpo. Apresenta uma semente por lóculo unilateralmente alada (SHIMIZU & YAMAMOTO, 2012).

Uma das características mais interessantes das flores deste gênero é a apresentação secundária de pólen. Nelas, os grãos de pólen são transferidos das anteras para o estilete, antes mesmo das flores estarem totalmente abertas, funcionando o estilete como a estrutura onde o pólen fica depositado, sendo o estigma terminal. Dessa forma, quando as flores começam a abrir e a receber os primeiros visitantes florais, a maioria já perdeu as anteras (OLIVEIRA & GIBBS 1994; OLIVEIRA, 1996; SANTOS et al. 1997; OLIVEIRA 1998).

2.2 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE *VOCHYSIA BIFALCATA*

A espécie *Vochysia bifalcata* Warm., é uma árvore brasileira nativa, popularmente conhecida como Guaricica, Pau-de-vinho, Vinheiro, Pau-amarelo, Canela-santa, Morici, Murici, Murici-vermelho e Caixeta-do-interior (LORENZI, 1998; CARVALHO, 2008). Encontram-se distribuída de forma natural na Floresta Ombrófila Densa sendo frequentemente encontradas nas encostas de morros nos estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (NEGRELLE et al., 2007; CARVALHO, 2008).

A espécie possui porte arbóreo, podendo alcançar até 35 m de altura e 150 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), com copa densa de caráter sempreverde ou perenifólia, tronco reto e cilíndrico, em que o fuste pode atingir até 18 m de comprimento. Sua casca mede até 15 mm de espessura. Apresentando sua casca externa ou ritidoma com coloração acinzentada com manchas brancas, exibindo fissuras longitudinais e com descamação em

lacas irregulares, sua casca interna é branco-amarelada. Suas sementes são alada, de coloração marrom-escura, com núcleo semínal basal, medindo até 3 cm de comprimento, incluindo a asa. Suas flores são amarelas e vistosas, florescendo de novembro a março. Seu fruto é do tipo cápsula trigona, deiscente, possuindo três sementes aladas, uma em cada lóculo, e a frutificação ocorre de novembro a dezembro (Figura 4) (LORENZI, 1998; NEGRELLE et al., 2007; CARVALHO, 2008).



Figura 4- (A) Indivíduo de *V. bifalcata* – **Fonte:** Fábio Demolinari de Miranda, 2013. (B) Flores de *V. bifalcata*; (C) Exsicata de *V. bifalcata*. **Fonte** (B e C): Herbarium Catalogue, 2014.

Por contagem dos anéis de crescimento, confirmou que a idade média da *V. bifalcata* é de aproximadamente 30 anos, mas a partir de 20 anos pode começar a morrer (CARVALHO,

2008). As árvores da espécie *V. bifalcata* a partir de 20 anos começam a exsudar a seiva (vinho) e apresentar gomose. Essa doença provoca lesões necróticas no tronco, sendo que o sintoma mais característico é uma abundante exsudação gomosa através da casca, raízes, troncos, ou galhos, cuja incidência tende a aumentar com a idade do povoamento (CARVALHO, 2008).

Segundo Negrelle (1998) o tipo preferencial de dispersão de frutos e sementes da espécie *V. bifalcata* é a disseminação anemocórica, ou seja, causada pelo vento. De acordo com o mesmo o sitesma sexual da espécie é hermafroditada, sendo seus principais vetores de polinização as abelhas grandes, destacando-se a abelha-mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e a abelha-mamangava (*Bombus morio*).

É uma espécie secundária inicial, que durante a regeneração natural apresenta crescimento rápido em altura e diâmetro, sendo, portanto, de extrema importância para o estabelecimento de florestas secundárias. Aloja-se na vegetação formando densos agrupamentos na fase de capoeira e se mantém dominante até a fase de capoeirão, ocorrendo principalmente em Cambissolos, nas encostas e menos frequente em solos aluviais da planície quaternária (CARVALHO, 2008).

A espécie *V. bifalcata* é considerada alumínio-dependente, adaptando-se melhor em solos com maior concentração de alumínio, mas bem drenados, com textura que varia de arenosa a franca, encontra-se preferencialmente em Floresta Ombrófila Densa Montana sob altitudes variando entre 500 a 1.500 m (FURLEY & RATTER, 1988).

A espécie *V. bifalcata* tem sido utilizada no processo de reflorestamento para recuperação de áreas degradadas. No entanto, é uma planta com baixa produção de mudas, o que ocasiona dificuldades no seu uso, por desconhecimento das suas condições para produção em viveiro, contudo, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando o melhoramento das formas de propagação para otimização da inserção da espécie nos programas de reflorestamento (DANNER et al., 2010; RICKLI, 2012). Paralelo a sua finalidade ecológica a *V. bifalcata* é considerada ainda como uma espécie ornamental, devido suas admiráveis flores amarelas, sendo indicada para a composição vegetal de parques (Figura 4) (CARVALHO, 2008).

A carência de técnicas de produção de mudas para espécies nativas e falta de viabilidade de sementes, indica a propagação vegetativa ou assexuada como alternativa na multiplicação de espécies arbóreas (LIMA et al., 2006)

Quanto à utilidade, sua madeira branca é bastante apreciada para a confecção de laminados para a produção de brinquedos, caixotaria, embalagens leves, obras de acabamento interno e externo e confecção de remos. Também é uma espécie que apresenta características adequadas para extração de celulose, produção de papel e proporciona lenha de boa qualidade, podendo ser utilizada no fornecimento de energia (NEGRELLE et al., 2007; CARVALHO, 2008). A resina proveniente do tronco da espécie é bastante apreciada como uma bebida *in natura* consumida pelos nativos, os quais a denominam vinho-de-guaricica (CARVALHO, 2008; MAYWORM et al., 2011).

O conhecimento da utilização de partes alternativas da planta, como as folhas, poderia melhorar o gerenciamento e os benefícios da aplicação econômica dessa espécie. Nesse sentido, considerar uma possível atividade biológica das folhas de *V. bifalcata* parece ser uma perspectiva promissora para nova utilização e aproveitamento da planta ampliando os benefícios socioeconômicos da cadeia produtiva da espécie. Embora não hajam relatos relacionados a essa espécie, diversas outras espécies do gênero *Vochysia* são utilizadas por comunidades tradicionais na América do Sul para aliviar os sintomas de doenças inflamatórias, entre as quais se destacam lesões cutâneas, doenças respiratórias como asma e congestão pulmonar e ainda distúrbios do trato gastrointestinal (GOMES RDE et al., 2009; WENIGER et al., 2005).

2.3 FERTILIDADE DOS SOLOS FLORESTAIS

A existência dos seres vivos no planeta está diretamente atrelada com a qualidade dos solos, uma vez que o solo é considerado como uma das maiores fontes de energia disponível. Para o crescimento e manutenção das espécies, faz-se necessário a compreensão da atuação do solo sobre as mesmas, pois, o solo funciona como um suporte para os ecossistemas, sendo considerado base para o desenvolvimento das plantas (BERTONI & LOMBARDI NETO, 1990).

O solo desempenha papel fundamental sobre os ecossistemas, sendo considerado o principal substrato utilizado pelas plantas para o seu crescimento e disseminação, fornecendo suporte mecânico, água e nutrientes (RODRIGUES et al., 2010).

O tipo de vegetação existente nos ecossistemas e sua formação estão intimamente relacionados com os atributos químicos do solo, acarretando aporte de carbono ao sistema, atuando como barreira física entre o solo e a atmosfera e enriquecendo-o através da ciclagem de nutrientes contidos na biomassa das espécies (VITOUSEK & SANFORD, 1986).

De acordo com o mesmo autor o conhecimento da fertilidade do solo é fundamental para o manejo adequado dos sistemas em uso, resultando em preservação da natureza, por evitar tomadas de decisões errôneas, e economia ao homem.

A disponibilidade de água, aeração, temperatura e resistência do solo à penetração das raízes são fatores que estão relacionados com a fertilidade dos solos florestais. Em solos degradados estas características encontram-se comprometidas, devido redução da taxa de difusão de oxigênio, da quantidade de água disponível no substrato e da resistência do solo à penetração, essas dadas características interferem diretamente no crescimento e no desenvolvimento da vegetação (ARAÚJO et al., 2007).

O monitoramento da qualidade do solo é realizado a partir do comportamento de indicadores ao longo do tempo, ou comparando seus desempenhos com valores já estabelecidos pela literatura através de resultados de pesquisas científicas ou adquiridos em ecossistemas naturais. As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo podem ser utilizadas com atributos de indicadores de fertilidade (DORAN; PARKIN, 1994; KARLEN et al., 1997).

A qualidade física do solo expõe o comportamento do solo em relação ao seu potencial de compactação, disponibilidade de água, aeração, condutividade do solo ao ar, à água e ao calor, infiltração e da redistribuição de água (PREVEDELLO, 1996).

A profundidade efetiva de enraizamento; a porosidade total, a distribuição e tamanho dos poros; a distribuição do tamanho das partículas; a densidade do solo; a resistência do solo à penetração das raízes; o intervalo hídrico ótimo; o índice de compressão e a estabilidade dos agregados são considerados os atributos mais utilizados como indicadores de qualidade física do solo (SCHOENHOLTZ et al., 2000). A densidade é comprometida pelo tipo de cobertura

vegetal existente, teor de matéria orgânica disponível e uso e manejo do solo (CORSINI & FERRAUDO, 1999).

A densidade elevada ocasiona redução do volume total de poros no solo, redução da permeabilidade e da infiltração de água, quebra dos agregados e aumento da resistência mecânica à penetração, o que consequentemente acarreta prejuízo à qualidade física do solo.

Em relação às propriedades químicas do solo, a matéria orgânica é comumente conhecida como um indicador químico de fertilidade, sendo também considerada como a principal fonte de nutrientes minerais para as plantas. Kaiser et al. (1995) ressaltam que a matéria orgânica é tida como um indicador de qualidade dos sistemas, uma vez que, seu declínio ou acréscimo permite mensurar a preservação e a restauração dos ecossistemas naturais, além dos desequilíbrios dos ecossistemas.

A estabilidade dos agregados do solo é conferida pelo teor de carbono orgânico disponível ao solo, sendo a matéria orgânica um dos principais reservatórios de carbono na superfície terrestre (SANTOS et al., 2008).

A matéria orgânica contribui ainda, no aumento do armazenamento e permeabilidade da água, assim como influencia a aeração do solo e favorece o fornecimento de nutrientes para as plantas. Promove a elevação da capacidade de troca catiônica (CTC), uma liberação lenta de fósforo, nitrogênio, enxofre e água, favorecendo ainda o controle biológico, pela maior população microbiana e melhoria da capacidade tampão do solo (RAIJ, 1991)

São diversos os trabalhos que utilizam os macronutrientes, micronutrientes, CTC e o pH do solo, como indicadores da qualidade química do solo (GOMES; FILIZOLA, 2006; MAIA et al., 2006; PAVANELLI; ARAÚJO, 2010; CARDOSO et al., 2011; RIBEIRO, 2011; ARAÚJO et al., 2012; SILVA, 2012).

Segundo Araújo & Monteiro (2007), os atributos biológicos do solo têm a capacidade de mensurar o nível de desequilíbrio ao qual um determinado ambiente está propício, sendo úteis para determinar os efeitos positivos e negativos sobre a fertilidade do solo e a sustentabilidade das práticas agrícolas e/ou da vegetação implantada no local. Os principais indicadores biológicos são biomassa microbiana, respiração, quociente respiratório e atividade enzimática do solo.

2.4 EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS

Em todo mundo, grandes extensões de florestas naturais fíran desvastadas em decorrência das pastagens, agricultura e construções civis, reduzindo-se assim o tamanho de grandes populações em pequenos fragmentos e promovendo alterações nos processos ecológicos e genéticos das espécies naturais que ali ocorrem (MARTINS et al., 2008).

Dentre os remanescentes florestais dos ecossistemas brasileiros, a Mata Atlântica encontra-se sujeita as perturbações antrópicas, este fato está atribuído principalmente pela presença de solos férteis e úmidos, alta diversidade de espécies e fontes de madeiras e de produtos florestais, por consequência, essas características têm contribuído para uma elevada taxa de desmatamento desse bioma (REIS et al., 2009). Uma das principais consequências dessas perturbações é a fragmentação dos ecossistemas naturais (VIANA & PINEHIRO, 2009).

Os efeitos da fragmentação foram inicialmente detectados em estudos de ecologia de populações, através da percepção da acentuada diminuição da riqueza das espécies. Com aprimoramento das técnicas moleculares, é possível perceber o efeito da fragmentação na composição genética das populações. Os parâmetros genéticos são considerados de extrema importância para caracterização de populações naturais por retratarem, de forma clara, o quanto as alterações ambientais influenciam a diminuição da variabilidade genética populacional (EWERS & DIDHAM, 2006).

A fragmentação de habitat reduz o tamanho efetivo de suas populações naturais podendo causar o isolamento reprodutivo das espécies e aumenta o isolamento espacial entre elas, sabe-se que estes processos de alteração ambiental causam erosão da variabilidade genética e aumento da divergência interpopulacional (YONG et al., 2001).

Uma das consequências genéticas desta fragmentação ambiental incluem a redução no número de indivíduos, declínio no tamanho populacional médio e aumento da probabilidade de extinção de fragmentos locais, causados através do (a) aumento da deriva genética, (b) do aumento dos níveis de endogamia intrapopulacional e (c) da redução do fluxo gênico entre as populações (SEOANE et al., 2005).

Conforme Ewers & Didham (2006) estes três fatores são consequências inevitáveis da redução do tamanho original dos habitats, tendo sérias implicações na persistência das espécies. A extensão no qual isto ocorrerá dependerá da extensão da perda de floresta e da estrutura genética das populações naturais presentes no momento da fragmentação, a imediata perda na heterozigosidade será evidente apenas se o tamanho populacional apresentar uma grande redução.

Em populações com tamanhos reduzidos pode ocorrer em curto prazo à deriva genética, o que pode resultar em perdas aleatórias dos alelos, altos níveis de endogamia causado pelo aumento da autofecundação e acasalamento entre indivíduos intimamente relacionados, causando a redução da diversidade genética dentro de populações remanescentes, aliado a isto, há ainda uma possível perda de genes adaptados aos ambientes específicos de ocorrências das espécies arbórea (ROGALSKI et al., 2003).

O comprometimento do fluxo gênico dificulta os fragmentos de constituírem uma metapopulação, reduzindo-se, na imensa maioria dos casos, o tamanho efetivo populacional, o que interfere na sua normal continuidade e evolução. A limitada conectividade causada pela redução do fluxo gênico entre os fragmentos diminui a chegada de própagulos, o que compromete a formação do banco de sementes para iniciar e, principalmente, para dar continuidade ao processo sucessional do ecossistema (VIEGAS, 2009).

Estudos realizados por Jump & Penuelas (2006) com a espécie *Fagus sylvatica* L., comprovaram o impacto negativo na diversidade genética em populações naturais que sofreram o processo de fragmentação florestal, comprometendo de forma preocupante do fluxo gênico. Os autores observaram elevados níveis de endogamia, devido ao aumento das taxas de autofecundação e do acasalamento entre indivíduos aparentados o que possivelmente resultou em elevada diversidade genética entre populações e a redução da diversidade genética dentro das populações.

A estrutura genética espacial (SGS) é diretamente influenciada por características históricas, por processos ecológicos, genéticos e demográficos sofridos pelas populações. Born et al. (2008) retratam que processos ecológicos como eventos de colonização recente, densidades sexuais diferentes e características históricas, como a variação no sistema de cruzamento e no modo de dispersão de semente, também afetam a SGS.

Ewers & Didham (2006), esclarecem que a fragmentação altera a SGS de uma população devido às modificações dos processos ecológicos, tais como as competições com espécies invasoras e o sistema reprodutivo das plantas.

Alguns parâmetros genéticos populacionais podem ser utilizados na quantificação do grau de fragmentação e na caracterização da estrutura genética de uma população. Dentre estes parâmetros, a diversidade genética, os níveis de endogamia e as medidas diretas e indiretas de fluxo gênico fornecem as melhores estimativas sobre o quanto à fragmentação atua estruturando a composição genotípica das populações. Do ponto de vista conservacionista, o monitoramento dos parâmetros genéticos pode fornecer informações de extrema importância para a tomada de decisões nos programas de manejo de espécies ameaçadas (ASHWORTH et al., 2004; COLLEVATTI et al., 2010).

O desconhecimento do padrão de distribuição genética das diferentes espécies florestais nativas, tem ocasionado deterioração da base genética, comprometendo o patrimônio genético dos ecossistemas e o potencial evolutivo das espécies, reduzindo assim, a capacidade das populações remanescentes se adaptarem às mudanças ambientais (MELO JÚNIOR et al., 2004; PINTO et al., 2004).

Informações acerca da composição genética das espécies e a forma que elas estão estruturadas dentro de suas populações são fundamentais para as ações de manejo e conservação das espécies na Unidade de Conservação, podendo cooperar na seleção de possíveis matrizes para coleta de sementes e produção de mudas para replantio (MYERS et al., 2000).

Martins et al. (2008), ressaltam que o estabelecimento de práticas conservacionistas e de estratégias adequadas de manejo dos remanescentes florestais são essenciais para a manutenção da diversidade genética e para a sobrevivência de populações fragmentadas de espécies arbóreas.

2.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) E AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA

A tecnologia de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats* - Sequências Simples Repetidas) consiste na amplificação de regiões microssatélites no genoma das espécies, via

PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia pela Polimerase), por meio de iniciadores específicos, geralmente de tamanho entre 20 a 25 pb (pares de base) (LITT & LUTY, 1989). Regiões microssatélites caracterizam-se por serem sequências de um a seis nucleotídeos adjacentes, repetidos em *tandem* (repetições de 10 a 60 vezes ou mais raramente até milhares de vezes), amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos (LEWIN, 2001).

Os microssatélites podem ser classificados de acordo com a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que pertença ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando existem entre os motivos pares de bases que não correspondem ao mesmo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGCACACACACACA (BORÉM & CAIXETA, 2009).

Normalmente, as sequências microssatélites variam de um indivíduo para o outro. No entanto, as sequências de DNA que as flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Isso permite a seleção de *primers* específicos e possibilita a amplificação dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos (BORÉM & CAIXETA, 2009).

Além disso, apesar da conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites, interrupções nessas regiões e nos próprios microssatélites podem ocorrer, pois, quando uma mutação, do tipo *in-del*, ou substituições, ocorre nas regiões que flanqueiam os microssatélites, que é complementar ao *primer*, o fragmento pode inibir ou impedir a ligação destes, esses são chamados alelos nulos (CALLEN et al., 2003). A presença desses alelos impossibilita a interpretação de dados de segregação devido ao fato do heterozigoto não ser identificado e às falhas nas reações de PCR que não podem ser detectadas (VARSHNEY et al., 2005).

Os SSRs estão presentes em regiões codificantes e não codificantes e geralmente são caracterizados por um alto grau de polimorfismo. São muito utilizados como marcadores moleculares por possuírem um atributo particular que é ter uma alta taxa de mutação quando comparados com o restante do genoma (JARNE & LAGODA, 1996).

A forma como se originam e a dinâmica de mutação dos SSRs no genoma dos organismos ainda é incerta (SCHLOTTERER, 2004), entretanto sabe-se que a taxa de mutação dos SSRs é muito alta quando comparada com outras partes do genoma (SIA, et al., 2000).

Muitos mecanismos já foram sugeridos para explicar as altas taxas de mutação dos SSRs, tais como: erros durante a recombinação, "*crossing over*" desigual e "*slippage*" da DNA polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (STRAND et al., 1993).

Sobre as teorias do mecanismo por trás do surgimento de sequências repetitivas de nucleotídeos nos genomas das espécies, a mais aceita é a explicação do processo de deslizamento da polimerase ou *slippage*, gerando uma alta taxa de mutação dos microsatélites (BORÉM & CAIXETA, 2009). Durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e se unem novamente de forma incorreta, o que originaria cópias de trechos de DNA (alelos) com tamanhos diferentes ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição. Outro fator também associado ao surgimento de sequências repetitivas é o processo de recombinação. Durante esse processo, o *crossing-over* desigual pode ser considerado responsável pela elevada taxa de polimorfismo destes marcadores. Os erros no pareamento dessas sequências durante o quiasma aumentam a taxa de mutação das regiões microsatélites e consequentemente estas mutações os tornam tão informativos (STRAND et al., 1993).

Os marcadores do tipo SSR são utilizados em um grande número de análises. Segundo Chase et al. (1996), os marcadores moleculares microsatélites são ferramentas úteis para a construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos e biologia da conservação. São considerados ideais para estudos de genética e evolução de populações, devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem mais informativos geneticamente (SLATKIN, 1995).

Uma das principais vantagens da utilização dos microsatélites é a possibilidade de proporcionar ao pesquisador maior conteúdo informativo. Os SSR distinguem-se dos demais marcadores por serem bem distribuídos pelo genoma e devido apresentarem polimorfismo do tipo codominante, permitindo a discriminação entre homozigotos e heterozigotos. Também

apresentam natureza multialélica e são suficientemente estáveis, com locos frequentemente conservados entre espécies relacionadas. Outras vantagens são a necessidade de pequenas quantidades de DNA para o estudo e a possibilidade de serem transferíveis entre espécies de um mesmo gênero ou gêneros distintos (GRATTAPAGLIA, 2001).

Os usos dessa tecnologia englobam algumas limitações, demandando um vasto conhecimento das sequências de DNA, o que significa um substancial investimento de tempo e dinheiro para o desenvolvimento destes marcadores. Entretanto, a proximidade evolutiva entre as espécies permite a transferência de iniciadores desenvolvidos de uma espécie para outra (amplificação heteróloga), uma vez que espécies relacionadas possuem homologia nas regiões flangeadoras das repetições microssatélites (BARBARÁ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006).

Uma das vantagens da amplificação heteróloga é a capacidade de transferir e aplicar o mesmo conjunto de iniciadores microssatélites em diferentes espécies, facilitando os estudos entre *táxon* relacionados, uma vez que a maior dificuldade em estudos de diversidade genética é o desenvolvimento de *primers* específicos para locos de repetições microssatélites (ALVES, 2007).

Estudos apontam que existe um padrão evidente na transferibilidade entre gêneros, entretanto as taxas de transferência são de aproximadamente 10% para eudicotiledoneas e quase limitada para monocotiledôneas (BARBARÁ et al., 2007).

A ocorrência da transferibilidade minimiza-se de acordo com a distância genética entre os *táxon* (PRIMMER E MERILÄ, 2000), ou seja, a proximidade evolutiva é o principal fator no sucesso da transferência para uso de *primers* heterólogos. Outros fatores que podem influenciar no processo de transferibilidade dos *primers* são: a complexidade do genoma e a localização dos microssatélites no genoma das espécies (OLIVEIRA et al., 2006).

Brondani et al. (1998) em seus estudos transferiram 100% de iniciadores desenvolvidos entre duas espécies de *Eucalyptus*, sendo que, dos 20 locos SSR analisados, 12 foram obtidos de bibliotecas genômicas de *E. grandis* e oito de *E. urophylla*, com absoluta transferibilidade entre as duas espécies.

Embora os custos para o desenvolvimento dos microssatélites sejam elevados, seu uso vem aumentando nos estudos relacionados à conservação. Porém, pesquisadores buscam cada

vez mais um marcador universal, que possa ser facilmente transferido entre espécies, visando facilitar as comparações entre *táxons* intimamente relacionados (BARBARÁ, 2007).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a diversidade genética da espécie *Vochysia bifalcata*, bem como, caracterizar a fertilidade do solo em duas populações nativas estabelecidas no Parque Nacional do Caparaó, ES.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a variabilidade genética intra e interpopulacional em populações nativas de *Vochysia bifalcata* pertencentes ao Parque Nacional do Caparaó/ES;
- Analisar a eficiência de amplificação heteróloga de marcadores microssatélites originalmente desenvolvidos para *Vochysia ferruginea* Mart. e *Qualea grandiflora* Mart. em amostras de DNA de *V. bifalcata*;
- Caracterizar marcadores microssatélites para a espécie *V. bifalcata* através do processo de transferibilidade;
- Determinar as características dos atributos químicos do solo;
- Gerar informações que poderão ser utilizadas para tornar mais eficientes estudos conservacionistas da espécie *V. bifalcata*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Parque Nacional do Caparaó (PARNA Caparaó), localiza-se na divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Figura 5) entre os paralelos 20°19's e 20°37's e os meridianos 41°43'w e 41°53'w (IBDF, 1981). A área do PARNA apresenta cerca de 31.800 hectares, dos quais 70% está contida no estado do Espírito Santo e 30% abrangem o estado de Minas Gerais. O PARNA está distribuído nos municípios mineiros de Alto Caparaó, Caparaó, Espera Feliz e Alto Jequitibá, além dos municípios capixabas de Divino de São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Ibitirama, Iúna e Irupi. Apresenta em sua maior extensão altitudes em torno de 2.000 metros, sendo o Pico da Bandeira conhecido nacionalmente pelos seus 2.890 metros (IBAMA, 1996).

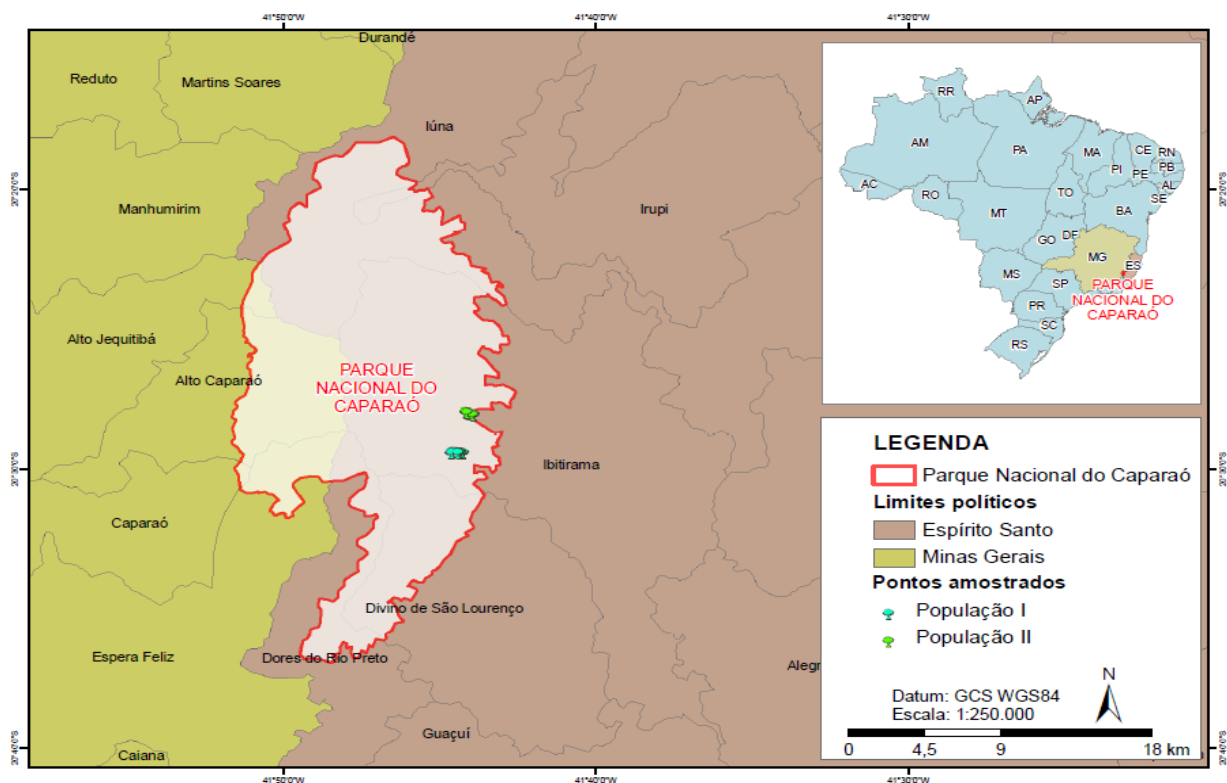


Figura 5 - Localização do Parque Nacional do Caparaó, com destaque para o local de estudos das populações nativas de *V. bifalcata* dentro do Parque. **Fonte:** Mateus Lima Rosa.

O clima do PARNA é classificado do tipo Cwb, clima tropical de altitude/subtropical (ALVARES et al., 2013). A temperatura média anual varia entre 19°C a 22°C, podendo chegar a temperatura máxima de 25°C e em cotas acima de 2000 m de altitude já foram registradas temperaturas de até -4°C. A pluviosidade média encontra-se mal distribuída ao longo do ano sendo acentuadas durante a estação de verão, variando entre 1.000 a 1.500 mm anuais, atingindo até 1.750 mm (IBDF, 1981).

Os solos do PARNA são classificados de baixa a média fertilidade sendo estes Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, Latossolo Vermelho Distrófico e Argissolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2013).

O Parque encontra-se situado na província biogeográfica da Floresta Pluvial do Brasil. Pertence ao Domínio Atlântico, ou Mata Atlântica. São encontradas formações vegetais de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Matas Ciliares e Campos de Altitude (IBDF, 1981). Na porção voltada para o estado do Espírito Santo a floresta típica é Ombrófila Densa, apresentando florestas em estágio mais avançado de regeneração e, além disso, mais úmidas, devido à retenção da água das massas de ar que se condensam em suas escarpas.

As duas populações do presente estudo estão inseridas em uma microbacia localizada na porção sul do Parque, contida dentro do estado do Espírito Santo, no município de Ibitirama.

A microbacia onde está inserida os pontos de coletas das áreas de estudo apresentam altitudes variadas, partindo desde de 872 aos 2486 metros. Compreende uma área total de 17.758,684 km² com declividades acentuadas, oscilando entre ondulado a escarpado de acordo com a classificação da Embrapa (1979), e orientação no sentido leste/oeste.

As áreas de estudo pertencente ao Domínio da Mata Atlântica com predominância de Floresta Ombrófila Densa Montana e vegetação rupícola típica dos campos de altitude (OLIVEIRA FILHO et al., 2006). A classe de solo que predomina nas duas áreas de estudo é o Latossolo Amarelo Distrófico Húmico, com classe textural argila a franco-argilosa (RODRIGUES, 2011).

De acordo com a altitude, ambas as populações encontram-se em torno de 1.100 metros, no entanto os pontos de coletas deste estudo encontram-se separados por um pico de

aproximadamente 1.900 metros. A distância média do Vale do Córrego Santa Marta (pop I) para o Vale do Córrego Calçado (pop II) é de aproximadamente 2,614 Km.

De acordo com informações obtidas por moradores locais, há cerca de 30 anos atrás as áreas onde encontram-se as duas populações estudadas nesta pesquisa eram ocupadas em quase toda sua extensão por mosaicos compostos por pastagens e lavouras de cafezais (principal atividade econômica da região). Essa área abandonada vem se regenerando naturalmente e atualmente muitos trechos do PARNA caracterizam-se pelo estágio sucessional secundário derivado pelo histórico de plantações de café e pastagens (IBAMA, 2007).

4.2 ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

4.2.1 IDENTIFICAÇÃO E AMOSTRAGEM DOS INDIVÍDUOS DE *V. BIFALCATA*

Os indivíduos foram identificados por meio do método de busca exaustiva e suas coordenadas geográficas e altitudes foram demarcados utilizando sistema de GPS (Figura 6).

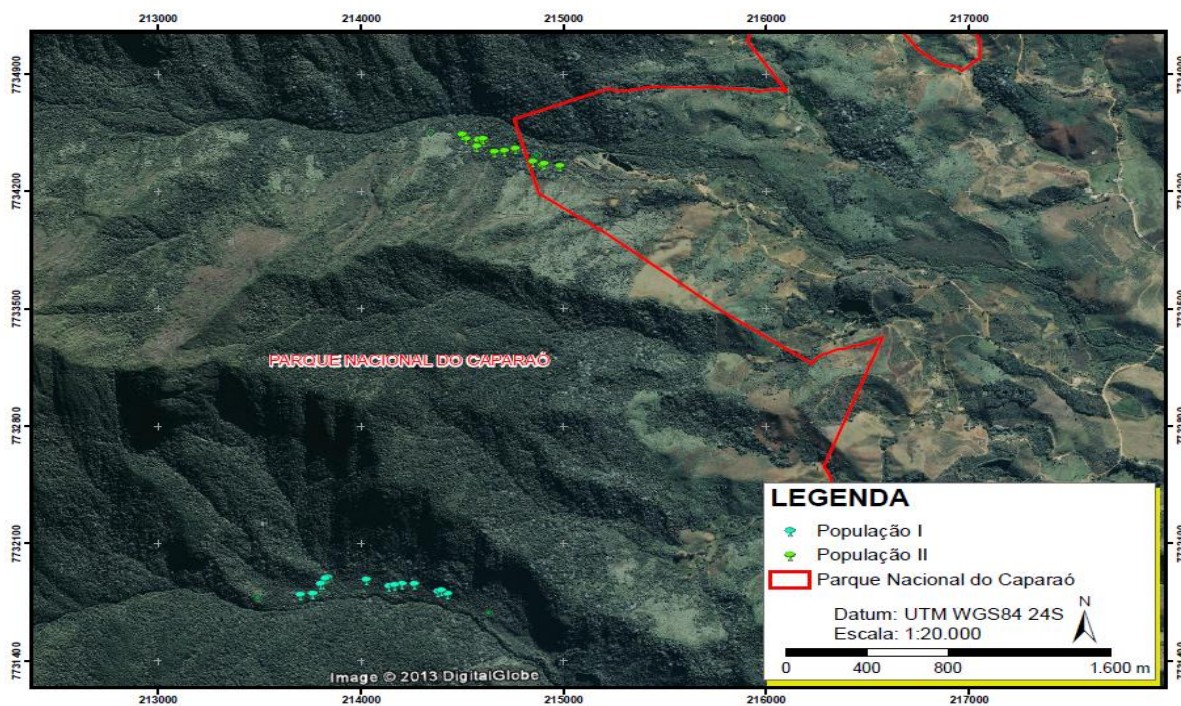


Figura 6 - Localização geográfica dos dois locais de coletas de *V. bifalcata* estudadas. **Fonte:** Mateus Lima Rosa.

Para a caracterização dendrométrica dos indivíduos foi utilizada uma fita diamétrica para medir o diâmetro a altura do peito (DAP) e a altura aproximada foi estimada visualmente. À campo, a escolha destes indivíduos foi baseada na aparência fenotípica, observando os seguintes aspectos: vigor e sanidade. A coleta dos tecidos foliares de cada indivíduo foi realizada no mês de abril do ano de 2013 com o auxílio de um estilingue, optando-se em coletar três folhas em estágio intermediário ou jovem.

Ao todo foram coletadas amostras foliares de 28 indivíduos adultos de *V. bifalcata* no município de Ibitirama, ES, sendo 15 indivíduos no Vale do Córrego Santa Marta (pop I) e 13 indivíduos no Vale do Córrego Calçado (pop II) (Tabela 1).

Na população I os indivíduos foram denominados de Voc 1 ao Voc 15 e na população II de Voc 16 a Voc 28, os indivíduos amostrados encontram-se localizados no terço médio e fundo de vale sob ecossistemas montanos em ambas populações.

Tabela 1 - Populações amostradas no Parque Nacional do Caparaó.

População	Latitude	Longitude	Nº de indivíduos
Vale do Córrego Santa Marta (pop I)	20°49'09.87''S	41°74'47.35''W	15
Vale do Córrego Calçado (pop II)	20°46'62.84''S	41°73'66.83''W	13
Total de indivíduos			28

Fonte: Autora.

Para avaliação dos dados dendrométricos diâmetro a altura do peito (DAP) e altura, utilizou-se a ferramenta de estatística descritiva. O diâmetro e a altura aproximada foram obtidos pela soma das médias ponderadas (Apêndice 1).

4.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico total foi isolado e purificado usando o método de extração de DNA total de plantas de Doyle & Doyle (1990) modificado. As folhas foram primeiramente lavadas em água destilada e álcool a 70%. Após a secagem, foi feita a maceração das folhas em nitrogênio líquido. Com aproximadamente 200mg de pó (folha macerada) transferiu-se para microtubos de 1,5 mL previamente identificados. Para cada amostra foi utilizada 900 µL de tampão de extração com a seguinte constituição: 2% v/v de CTAB, 1,4 mol/L de NaCl₂, 20 mmol/L de EDTA, 100 mmol/L de Tris-HCl a pH 8,0; 2% p/v de Polivinilpirrolidona sólida e 0,2% v/v de β-mercaptoetanol.

A mistura foi homogeneizada no vórtex por 20 segundos e incubada em banho- maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm em centrífuga Heitich Zentrifugen MIKRO 200 e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Adicionou-se ao sobrenadante um volume igual da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram suavemente homogenizados e centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm. Em seguida, a fase superior foi transferida para outros tubos e adicionou-se 5 mol/L de NaCl₂ (proporção 1:1 de NaCl₂:sobrenadante) e isopropanol (proporção 2:3 de isopropanol: sobrenadante). Os microtubos foram suavemente agitados e incubados a - 20 °C por uma noite (*overnight*).

Após esta etapa, todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm, e removido o sobrenadante. O precipitado foi lavado uma vez com álcool a 70% e outra vez com etanol 95%, secando à temperatura ambiente. Este precipitado foi ressuspensionado em 0,2 mL de TE (10 mmol/L de Tris-HCl, 1mmol/L de EDTA a pH 8.0), contendo RNase na concentração final de 40 µg/mL e incubado em banho-maria a 37 °C por uma hora e meia. Posteriormente os tubos foram levados à centrífuga e removeu-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, seco à temperatura ambiente e em seguida ressuspensionado em TE e armazenado a -30°C.

A quantificação de DNA das amostras, foi efetuada por meio do método espectrofotométrico, com o equipamento NanoDrop, uma vez que para se prosseguir o estudo faz necessário certificar se as amostras de DNA apresentam um grau de pureza adequado, após

está quantificação o DNA foi diluído em água de osmose em uma concentração apropriada (10 ng/μL) para em sequência ser utilizado em amplificação por PCR.

4.2.4 TESTE DE AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA

Para avaliação da amplificação cruzada, amostras de DNA de cinco indivíduos de *V. bifalcata* foram utilizadas nas PCRs com oito marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para *Q. grandiflora* (RITTER et al., 2012) (Tabela 2) e dez para *V. ferruginea* (LOWE et al., 2002) (Tabela 3). Os marcadores que geraram amplificações satisfatórias foram então utilizados para os estudos de diversidade e estrutura genética em todos os indivíduos amostrados. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Tabela 2 - Locos microssatélites utilizados para os testes de amplificação cruzada, incluindo nome da espécie para a qual o marcador foi originalmente desenvolvido, em que Q= *Qualea grandiflora*, nome no locus, sequência do par de primers e número de acesso no GenBank, motivo da repetição microssatélite.

ESPÉCIE	NOME DO LOCUS	SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS 5' → 3'	NÚMERO DE ACESSO	MOTIVO
Q	Qgr1	F: CACTGGCGATTTCATTTCTCA R: GCCCAACCGAGTAAACAAG	JN230425	(TC) ₁₄
Q	Qgr2	F: GACGATGAGTTTCATTAGC R: TGATTGAGAATGGGGGACT	JN230426	(CT) ₈
Q	Qgr3	F: ATACAATGTCGGGGAGGAC R: CGTAAAACTCAATTCATCG	JN230427	(CT) ₁₂
Q	Qgr4	F: TCAGAGCACTCAAGCAACG R: CAAACTAATGGAGGAGGA	JN230428	(GA) ₁₁
Q	Qgr5	F: CGCAAAATCCCCATCTTATC R: TGCTCCTTGAGTGCTGTGA	JN230429	(TC) ₂₀
Q	Qgr6	F: GCTTTATGTCTTTTGGTTTG R: TTCTTCTTCTTCCTCGCAGA	JN230430	(CT) ₁₇
Q	Qgr7	F: AATGTGTTCCAAACCAGTG R: AAGTGTGCGTGTGCGTGT	JN230431	(TC) ₁₁ (CA) ₈
Q	Qgr8	F: TGCCTAAGCGTAAAATCTC R: ACATTGCCACGGGAGTAAG	JN230432	(CT) ₁₁

Fonte: RITTER et al., (2012).

Tabela 3- Locus microssatélites utilizados para os testes de amplificação cruzada, incluindo nome da espécie para a qual o marcador foi originalmente desenvolvido, em que V= *Vochysia ferrugínea*, nome no locus, sequência do par de *primers* e número de acesso no GenBank, motivo da repetição microssatélite

ESPÉCIE	NOME DO LOCUS	SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> 5' → 3'	NÚMERO DE ACESSO	MOTIVO
V	A1-5	F:CCCCCACTCCTCTTCATATAGT R:AAAATGGAAGCAAATGGAAAAT	AF436086	(GA) ₁₆
V	A1-26	F: TATGCTGAAC TTTACCC CAGAAA R:TGGACACTAATCAAGCATTATGG	AF436085	(GA) ₁₀ AA(GA) ₉
V	A1-20	F: TAGTCCCTAGTCCCTAATCCCC R: CTTCAGATACATTCCCTCTCCTC	AF436079	(GT) ₈ GAGT(GA) ₁₂
V	A1-10	F: CAAAATAAGCACAAAGTAGCTG R: GGGTCCACTCTAATGGCT TGT TA	AF436082	(GA) ₁₃
V	A1-15	F: ACAGGAGTAGTCACCTTCATCCA R: GACATGCAATACAATCGACACG	AF436083	(GA) ₁₂
V	A1-35	F: GGTCTACTCATATCATGCCGAAC R: ATGAATGGATT TACCGTCTACCC	AF436087	(GA) ₁₇
V	A1-33	F: GTTCACACGAAGCAACTGAGAC R: GAGACGCAGAGATTAGGAACTT	AF436088	(GA) ₁₅
V	A1-36	F: GTCATTCTCATTTTCTCCCTCAG R: TCGTAGCTGTGCTCCAAAAGTA	AF436080	(GA) ₁₀
V	AL-8	F: TAGCCAAGGAAAGGGTTCTTCTA R GGACTACGGACATTGGTAATGAA	AF436081	(GA) ₁₀
V	A1-39	F: AACAAAGATGGGAGTCCACAGTT R:TGCATAACAGGAGCAGAATCCTT	AF436084	(GA) ₅ GG(GA) ₆ (G G(GA) ₆

Fonte: LOWE et al., (2002).

Buscando aperfeiçoar o resultado das PCRs, inicialmente foram determinadas as temperaturas ótimas de anelamento para cada um dos pares de *primers* a serem analisados de acordo com o trabalho de origem (Tabela 4). Posteriormente, foram realizadas diversas reações de PCRs com gradientes de temperaturas. As variações nos gradientes de temperatura se aproximavam das temperaturas indicadas na literatura para cada um dos pares de *primers*, onde as temperaturas variaram entre 55°C a 60°C.

Tabela 4- Temperatura de anelamento (T_A) específica para cada um dos pares *de primers* testados, em que Q= *Qualea grandiflora* e V= *Vochysia ferruginea* de acordo com trabalhos desenvolvidos por Ritter et al. (2012) e Lowe et al. (2002), respectivamente.

ESPÉCIE	LOCUS	T_A (°C)
Q	Qgr1	58
Q	Qgr2	58
Q	Qgr3	56
Q	Qgr4	58
Q	Qgr5	58
Q	Qgr6	58
Q	Qgr7	54
Q	Qgr8	58
V	A1-5	58
V	A1-8	55
V	A1-10	55
V	A1-15	55
V	A1-20	55
V	A1-26	55
V	A1-33	55
V	A1-35	55
V	A1-36	55
V	A1-39	55

Fonte: RITTER et al. (2012) e LOWE et al. (2002).

Determinada a temperatura ótima de anelamento para cada par de *primers*, foram testadas em seguida diferentes concentrações de $MgCl_2$ (variando entre 1,5 mM e 1,8 mM) com a finalidade de melhorar a qualidade da visualização dos produtos da amplificação.

Após a otimização dos *primers*, as amplificações para as análises do polimorfismo genético foram conduzidas nas mesmas condições de amplificação citadas abaixo, entretanto, para cada par de *primer* foi utilizada uma temperatura de anelamento ótima e a melhor concentração de $MgCl_2$ obtida no teste de concentração.

As concentrações dos reagentes utilizados para amplificações de PCR foram estabelecidas segundo trabalhos elaborados para cada espécie, como segue:

• **Condições de PCR para SSR de *V. ferruginea*:** Em todos os casos, os locos microssatélites foram amplificados em um volume final de reação de 15µL contendo 1,5 mM de MgCl₂, 20mM/50mM de Tris/KCl pH 8.4, 0,2mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,2 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e 20 ng de DNA (LOWE et al., 2002).

• **Condições de PCR para SSR de *Q. grandiflora*:** também foi adotado um volume final de reação de 15µ nas seguintes condições 1,5 mM de MgCl₂, 20mM/50mM de Tris/KCl pH 8.4, 0,2mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,8µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e 20 ng de DNA genômico (RITTER et al., 2012).

As amplificações de produtos de PCR de *V. ferruginea* foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti), utilizando um protocolo de touchdown, como se segue: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 11 ciclos constituídos por três etapas de touchdown em que a temperatura de anelamento diminuía 1°C entre cada ciclo: a) 15 segundos a 95°C, b) 25 segundos a 65°C e c) 35 segundos a 72°C, após essa etapa inicia-se 25 ciclos constituído por mais três etapas, com temperatura de anelamento de 55°C: a) 15 segundos a 95°C, b) 25 segundos a 55°C e c) 35 segundos a 72°C, com uma etapa final de extensão a 72°C durante 15 minutos.

As amplificações de produtos de PCR de *Q. grandiflora* foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti), utilizando-se o seguinte protocolo: um passo inicial de desnaturação de 1 minuto a 94°C, seguido por 35 ciclos de amplificação constituído por três etapas: a) 1 minuto a 94°C, b) 1 minuto a uma temperatura específica de anelamento de cada par de *primer*, c) 1 minuto a 72°C e um passo de elongação final de 10 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, em tampão TBE 1X em cuba vertical, em uma corrente de 100 Volts por aproximadamente cinco horas, em seguida os géis foram corados em brometo de etídeo e fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta. As análises foram baseadas no

número e tamanho de fragmentos amplificados e detecção de polimorfismos, o tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb.

4.2.5 ANÁLISES DOS DADOS MOLECULARES

A partir da observação das imagens dos géis foi gerada uma matriz de codificação dos genótipos individuais considerando o tamanho dos alelos em cada loco. O código para o valor perdido foi determinado conforme metodologia de cada software utilizado nas análises.

O número de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada (H_o), a heterozigosidade esperada (H_e), os índices de fixação (F) e o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) foram estimadas utilizando o programa Genes (CRUZ, 2013).

Os valores de similaridade genética entre indivíduos na população foram estimados através do complemento do índice ponderado a partir dos dados moleculares. As estimativas de dissimilaridade genética ($d_{ii'}$) foram feitas de acordo com o complemento aritmético do índice ponderado e empregadas na análise de agrupamento pela ligação média entre grupos utilizando o método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean* - Agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foram calculados, a fim de verificar a consistência do agrupamento. Essas análises foram realizadas utilizando os softwares Genes (CRUZ, 2013).

A estatística F , clássica de Nei (1973), foi calculada para quantificar os níveis de variação alélica dentro e entre as populações e para inferir o grau de subdivisão das mesmas. A riqueza alélica (R_s), medida através do número total de alelos na população foram realizadas utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 2002). Utilizando o mesmo programa foi realizado o teste de significância de F pelo procedimento de 10.000 permutações sobre os locos ao nível de 5% de probabilidade.

A presença de alelos nulos foi verificada utilizando o programa MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). A frequência de alelos nulos para cada locus foi estimada pelo método de Brookfield 1, incluído no programa, que é o mais indicado quando toda a ausência de amplificação não se deve a artefatos técnicos, mas sim a uma homozigose para alelos nulos (BROOKFIELD et al., 1996).

A análise molecular da variância (AMOVA) hierárquica foi realizada no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005) para avaliar os padrões de distribuição da variação genética interpoblacional, com cada modelo hierárquico sendo testado por 10.000 permutações e o número de migrantes ou fluxo gênico histórico foi calculado usando o softwares Popgene versão 1.32 (YEH & BOYLE, 1997).

A estrutura genética populacional foi estimada utilizando a análise Bayesiana para inferir o número de agrupamentos genéticos nas populações amostradas utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). O número de agrupamentos presumidos (K) foi extraído de $K=1$ a $K=5$, e 20 corridas independentes foram feitas para cada valor de K . Para a seleção do número ideal de grupos genéticos (valor verdadeiro de K) foi utilizada a metodologia proposta por Evanno et al. (2005), cuja metodologia utiliza a estatística de ΔK baseada na taxa de mudança na probabilidade dos logaritmos de cada um dos grupos genéticos (K) sucessivos.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO

4.3.1 COLETA E ANÁLISE DE SOLO

Para descrever os atributos químicos do solo da população I (Vale do Córrego Santa Marta) e população II (Vale do Córrego Calçado), as coletas foram realizadas em maio de 2014. Inicialmente selecionou-se aleatoriamente seis pontos de amostragem de solos em cada população, totalizando doze pontos de coletas, os solos foram coletados sob a copa das árvores da espécie em estudo (*V. bifalcata*) nos quatro pontos ortogonais, em três profundidades: 0 – 5; 5 – 10 e 10 – 20 cm, com o auxílio de um enxadão.

As amostras de solo foram secas ao ar, destorroadas, passadas em peneira de 2 mm e reservadas para análise. Após o preparo da Terra Fina Seca ao Ar (TFSA) as análises químicas foram realizadas seguindo metodologia proposta pela EMBRAPA (1997) no laboratório de Recurso Hídricos do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira/CCA-UFES.

Foram analisados os atributos químicos do solo pH em água, CTC efetiva (t), CTC a pH 7,0 (T), matéria orgânica (MO), carbono orgânico (C_{org}), fósforo, potássio, cálcio, magnésio, alumínio, soma de base (SB), saturação por alumínio (m), saturação em bases (V).

4.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO

Optou-se pela realização da análise dos dados por meio de testes não paramétrico, pois, o estudo não se enquadra em nenhum modelo de delineamento experimental, para comparação dos atributos químicos do solo. Assim, o teste de U de Mann-Whitney (Wilcoxon) foi selecionado, onde as medianas são comparadas par a par (SCHEER et al., 2011). Esse teste não utiliza valores médios em seu cálculo, mas verifica se as distribuições de probabilidade de uma variável podem ser consideradas iguais nas duas populações de amostras em estudo (SIEGEL, 1975).

Os resultados obtidos foram comparados com os níveis críticos de fertilidade para os solos do estado do Espírito Santo segundo classificação proposta por Prezotti et al. (2007) e segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos proposto pela Embrapa (2013).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, realizada para cada profundidade e foi calculado o desvio padrão. A tabulação dos dados foi realizada como auxílio do Microsoft Excel 2010 e o Programa Assistat versão 7.7 na realização do teste estatístico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÕES DENDROMÉTRICAS

A altura aproximada dos indivíduos de maior e menor tamanho foi 35,0 e 14,0 m, respectivamente, ambos pertencentes à população II. O indivíduo Voc 20 apresentou 128,0 cm de DAP, sendo considerado o maior entre as duas populações, já o indivíduo Voc 6 apresentou o menor DAP encontrado nas duas populações exibindo um valor de 24,3 cm.

Segundo os autores Lorenzi (1998); Negrelle et al. (2007); Carvalho (2008), a espécie *V. bifaltaca* possui porte arbóreo, podendo alcançar de 15,0 a 35,0 m de altura, essa variação foi observada entre os indivíduos estudados que apresentaram média de 20,4 m na população I e 26,0 m na população II, apresentando uma média geral (pop I + pop II) de 22,1 m. Com relação ao DAP, a média dos indivíduos da população I foi de 63,7 cm e os da população II de 75,5 cm e para ambas populações (pop I + pop II) foi de 64,2 cm, valor este situado entre a média de DAP para a espécie, que, segundo os mesmos autores situa-se entre 60,0 a 150,0 cm. Os dados dendrométricos dos indivíduos de *V. bifalcata* e a posição da paisagem estão apresentados no Apêndice 1.

A espécie *V. bifalcata* tem sido utilizada no processo de reflorestamento para recuperação de áreas degradadas por apresentar crescimento rápido em altura e diâmetro, sendo, portanto, de extrema importância para o estabelecimento de florestas secundárias (DANNER et al., 2010; RICKLI, 2012).

5.2 ESTUDO DE AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA

Após testes de gradiente de temperaturas para cada par de *primer* testado de *Q. grandiflora*, ficou evidenciado que a temperatura de anelamento ótima foi de 58°C, exceto para o loco Qgr7 que apresentou temperatura ótima de anelamento de 56°C. Para todos os pares de *primers* de *V. ferruginea* testados estabeleceu-se uma temperatura de anelamento específica de 55°C, conforme já apresentado por e Lowe et al. (2002) em seu trabalho com os mesmos iniciadores (Tabela 5).

Tabela 5- Temperatura de anelamento (T_A) específica para cada um dos pares de *primers* testados de acordo com trabalhos desenvolvidos por e Ritter et al. (2012); Lowe et al. (2002) e trabalho original, em que Q= *Qualea grandiflora* e V= *Vochysia ferruginea* nome no locus.

Espécie	Locos	T_A (°C)*	T_A (°C)***
Q	Qgr2	58°C	58°C
Q	Qgr3	56°C	58°C
Q	Qgr4	58°C	58°C
Q	Qgr6	58°C	58°C
Q	Qgr7	54°C	56°C
Espécie	Locos	T_A (°C)**	T_A (°C)***
V	A1-10	55°C	55°C
V	A1-15	55°C	55°C
V	A1-20	55°C	55°C
V	A1-26	55°C	55°C
V	A1-33	55°C	55°C
V	A1-35	55°C	55°C
V	A1-39	55°C	55°C

Fonte: * Resultados obtidos por RITTER et al. (2012); ** Resultados obtidos por LOWE et al. (2002) e *** Resultado obtido pelo presente estudo.

No que se refere à eficiência dos marcadores microssatélites utilizados, dos oito pares de iniciadores de *Q. grandiflora*, cinco (62,5%) geraram produtos de amplificação satisfatórios, apresentando similaridade de sequências nas regiões flangeadoras dos microssatélites, porém se mostraram monomórficos.

O perfil monomórfico encontrado nesta pesquisa pode ser atribuído às pequenas diferenças de tamanho entre os alelos, o que provavelmente dificultou a genotipagem dos indivíduos no gel de poliacrilamida 10%, pois, nesse sistema de genotipagem, alelos que apresentam diferenças menores do que cinco pares de bases, no tamanho dos fragmentos, normalmente são difíceis de serem distinguidos.

Existe um decréscimo do polimorfismo quando se analisa amplificação de *primers* heterólogos em espécies com certa distância genética evolutiva (gêneros distintos), devido, principalmente, à presença de alelos nulos (PRIMMER & MERILÄ, 2000). De acordo com Callen et al. (2003), a utilização de *primers* heteroespecíficos pode produzir alelos nulos, pois qualquer mutação que ocorra na sequência de DNA complementar ao *primer* pode inibir ou impedir a ligação destes, levando a uma redução ou perda completa do produto PCR.

Dayanandan et al. (1999) usaram iniciadores desenvolvidos para uma árvore tropical, *Pithecellobium elegans*, almejando encontrar locos de SSR que se mostrassem satisfatórios para amplificar o genoma de outras espécies da mesma família (Leguminosae), fizeram a genotipagem utilizando 13 espécies pertencente à família das Leguminosae, sendo 12 da sub-família Mimosidae e uma da família Papilionoidae, alcançaram 50% (seis pares de *primers*) de sucesso em amplificação em espécies do mesmo gênero e de gêneros diferente, no entanto, todos os locos se mostraram monomórficos.

Uma transferência de microssatélite bem sucedida não depende somente da proximidade filogenética entre as espécies está pode ser afetada por vários fatores, como o tamanho, complexidade do genoma e se estes pertencerem ou não a regiões codificantes. (BARBARÁ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006).

Dos dez pares de iniciadores de *V. ferruginea*, sete (70%) geraram produtos de amplificação satisfatórios, este resultado pode ser atribuído ao fato de *V. bifalcata* pertencer ao mesmo gênero da espécie para a qual os *primers* foram desenvolvidos. Assim, é de se esperar que ambos os genomas apresentem similaridade de sequência nas regiões flangeadoras de microssatélites, evidenciando que a proximidade evolutiva entre *táxons* está diretamente relacionada ao sucesso da transferibilidade de marcadores SSR (BARBARÁ et al., 2007).

Em árvores tropicais, várias pesquisas, têm evidenciado uma alta razão de transferibilidade de locos SSRs entre espécies arbóreas taxonomicamente relacionadas, podendo citar as Leguminosae (GARCIA et al., 2007), Meliaceae (WRITE & POWELL, 1997), Malvaceae (ALVES, 2007), *Caesalpinia echinata* (MELO et al., 2007), *Acrocomia aculeata* (NUCCI et al., 2008), *Hymenaea courbaril* (BUONAMICI et al., 2008) e *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 1998).

Em estudo com a *Caryocar brasiliense* e para cinco outras espécies do mesmo gênero (*C. coriaceum*, *C. edule*, *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*), Collevatti et al. (1999), verificaram a absoluta transferibilidade (100% de 10 locos), indicando um alto nível de homologia do genoma e permitindo, dessa forma, estudos comparativos da estrutura genética em todas estas espécies, comprovando que a proximidade evolutiva está intimamente ligada ao sucesso do processo de transferibilidade.

Ciampi et al. (2000), em seus estudos com *Copaifera langsdorffii* relataram taxa de transferibilidade de 75% de *Copaifera langsdorffii* para *Copaifera reticulata*, este dado encontrado pelos autores estão de acordo com os resultados adquiridos no presente estudo, demonstrando a eficiência da amplificação heteróloga entre espécies pertencentes ao mesmo gênero. Vale ressaltar que outros estudos vêm sendo conduzidos utilizando-se de *primers* heterólogos em plantas (FERES et al., 2009; KULEUNG et al., 2004; NG et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009; TEHRANI et al., 2008; WÜNSCH, 2009).

Os iniciadores desenvolvidos para *Q. grandiflora* se mostraram monomórficos, apresentando apenas um alelo por loco. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 100 pb para o alelo de menor tamanho e de 220 pb para o de maior tamanho. Os tamanhos dos fragmentos obtidos, de forma geral, corresponderam ao tamanho esperado de acordo com o estudo desenvolvido por Ritter et al. (2012), como exceção do *primer* Qgr4. Observou-se que a maioria dos alelos obtidos apresentaram tamanho de fragmentos com no máximo seis pb menores que ao esperado do trabalho de origem (RITTER et al., 2012), evidenciando a possibilidade de alguma mutação, do tipo deleção, na região amplificada da população analisada, ou ainda diferença de sensibilidade da técnica de PCR utilizada.

Para os *primers* desenvolvidos para *V. ferruginea* o número de alelos identificados por loco variou entre quatro e seis, com média de 4,85 alelos/loco, sendo que o maior número de alelos por loco foi observado para os locos A1-10 e A1-15 (Tabela 6), sendo ambos microssatélites dinucleotídeos. De acordo com Sibov et al. (2003), essa classe de microssatélite é a mais abundante no genoma, apresentando maior número de alelos. O tamanho dos alelos encontrados neste estudo variou de 98 pb para o alelo de menor fragmento e de 212 pb para o de maior fragmento.

Variação no número de alelos semelhante foi encontrada no estudo de Lowe et al. (2002) com *V. ferruginea* ao caracterizarem locos de SSR, em que o número de alelo por loco também variou de três a seis, como média de 4,14 alelos/loco.

Comparando a magnitude dos tamanhos dos fragmentos (pb) de cada loco transferido (*V. bifalcata*) em relação à distribuição na espécie em que foi desenvolvida (*V. ferruginea*), encontrou-se que os tamanhos dos fragmentos observados apresentaram resultados similar com o estudo desenvolvido por Lowe et al. (2002), exceto para os locos A1-15, A1-20 e A1-

35, que apresentou um tamanho de fragmento maior, evidenciando a possibilidade de alguma mutação, do tipo inserção, na região amplificada.

De acordo com Tarnowski (2010), o tamanho do fragmento detectado para a espécie em que o *primer* foi desenvolvido pode não ser encontrado no correspondente loco de outra espécie após o processo de transferibilidade. Tais diferenças entre tamanho observado e esperado pode ser devido a eventos mutacionais do tipo *in-del* (inserção – deleção), os quais podem desviar o tamanho da repetição do alelo observado, adquirindo sequências que apresentam tamanhos fora do padrão para o alelo esperado (BALLOUX & LUGON-MOULIN et al., 2002; ANMARKRUD et al., 2008; GUGERLI et al., 2008).


Nas duas populações, dois do sete locos analisados sugeriram a possível presença de alelos nulos, com frequência significativa. A presença destes alelos nulos foi verificada para os locos A1-33 com frequência de 0,244 e para o locos A1-35 com frequência de 0,151 (Tabela 6). O seu aparecimento produz um erro importante nas proporções genotípicas, devido ao fato do heterozigoto não ser identificado de modo que se observa um claro desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a um excesso de homozigotos e déficit de heterozigotos.

De acordo com Kim et al. (2004), em espécies que foram analisadas através do processo de transferibilidade com marcadores SSRs, possivelmente a frequência de alelos nulos será maior do que em espécies que foram avaliadas com marcadores microsatélites desenvolvidos para a espécie alvo, devido uma maior possibilidade de ocorrência de mutação na sequência de DNA.

Tabela 6- Resultados das amplificações e parâmetros genéticos dos marcadores microssatélites do trabalho de origem e do presente estudo. A= Número de alelos por loco, FAN= Frequência de alelos nulos.

Espécie	Locos	*Tamanho dos fragmentos	Tamanho dos fragmentos	A*	A***	FAN (Q)
Q	Qgr2	208 - 222 pb	210 pb	7	1	-
Q	Qgr3	206 - 242 pb	200 pb	15	1	-
Q	Qgr4	224 - 260 pb	100 pb	19	1	-
Q	Qgr6	204 - 238 pb	200 pb	11	1	-
Q	Qgr7	186 - 208 pb	220 pb	12	1	-
Média				12,8	1	-
Espécie	Locos	**Tamanho dos	Tamanho dos	A**	A***	FAN (V)
V	A1-10	194 pb	194 - 210 pb	3	6	0,088
V	A1-15	92 pb	98 - 118 pb	6	6	0,085
V	A1-20	109 pb	152 - 174 pb	7	4	0,028
V	A1-26	192 pb	190 - 204 pb	5	5	0,240
V	A1-33	148 pb	140 - 154 pb	3	4	0,244
V	A1-35	170 pb	196 - 210 pb	4	4	0,151
V	A1-39	199 pb	196 - 212 pb	1	5	0,008
Média				4,142	4,857	-

Fonte: * Resultados obtidos por RITTER et al. (2012); ** Resultados obtidos por LOWE et al. (2002) e *** Resultados obtidos pelo presente estudo.

 - Significativos.

5.3 ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

Os resultados deste estudo mostraram que a riqueza alélica (R_s) teve média de 3,567 na população I variando entre 1,999 e 4,679 e na população II, a média da riqueza alélica (R_s) foi de 3,502 variando entre 2,714 e 4,791 (Tabela 7). No presente estudo, os valores de riqueza alélica foram similares entre as duas populações e está de acordo com a maioria dos estudos de caracterização de locos microssatélites para espécies de árvores tropicais (ANGRIZANI, 2008).

White et al. (1999), em seus estudos observaram redução da riqueza alélica (média de 0,18) devido a fragmentação do habitat na espécie arbórea *Swietenia humilis*. Estes autores encontraram que os alelos de baixa frequência na população foram perdidos.

Conforme apresentado na Tabela 7, observa-se que em ambas populações e para a maioria dos locos estudados a heterozigosidade observada (H_o) foi inferior a heterozigosidade esperada (H_e), exceto para o loco A1-39 da população II, esses resultados evidenciam que o percentual de heterozigose observado nas duas populações foi diferente do esperado para o

equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando que para as ambas populações existe um excesso de indivíduos em homozigose em detrimento dos heterozigotos (WRIGHT, 1965).

Tabela 7- Resultados dos parâmetros genéticos dos 7 marcadores microssatélites. RS= Riqueza alélica, Ho=Heterozigosidade observada, He= Heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy Weinberg.

Locos Parâmetros	A1-10	A1-15	A1-20	A1-26	A1-33	A1-35	A1-39	Média
Rs (pop I)	1,999	4,371	4,465	3,389	2,356	3,716	4,679	3,567
Rs (pop II)	2,978	2,714	4,791	3,000	3,611	4,421	3,000	3,502
Ho (pop I)	0,230	0,538	0,900	0,200	0,071	0,461	0,636	0,434
He (pop I)	0,565	0,757	0,755	0,635	0,517	0,692	0,764	0,669
Ho (pop II)	0,500	0,428	0,174	0,200	0,222	0,300	0,666	0,355
He (pop II)	0,645	0,561	0,765	0,580	0,617	0,595	0,652	0,630

Fonte: Autora.

Outras estudos realizados por diferentes autores utilizando marcadores microssatélites em espécie arbórea também verificaram valores de Ho inferiores a He, tais como: *Tabebuia cassinoides* (SEBBENN et al., 2008), encontraram valores de 0,314 e 0,266 para He e 0,266 e 0,174 para Ho; *Cariniana legalis* (SEBBENN, 2001), o autor detectou valores de He variando de 0,348 a 0,350 e de Ho de 0,263 a 0,287; *Eschweilera ovata* (GUSSON et al., 2005), observaram valores de 0,400 e 0,431 para He e 0,389 e 0,388 para Ho e para *Chorisia speciosa* St. Hil. (SOUZA et al., 2009), indicando que os indivíduos destas populações possivelmente estão se entrecruzando ou que apresentam o sistema preferencial de autofecundação, ocasionando assim o excesso de indivíduos homozigotos.

Está baixa diversidade genética pode estar atribuída ao fato de que as populações possivelmente tenham enfrentado um evento fundador recentemente, onde uma nova colônia foi iniciada por alguns poucos membros da população original. De acordo com relatos de moradores do entorno, há aproximadamente 30 anos as áreas onde as populações estão inseridas eram utilizadas para a agricultura local (plantações de cafezais) e para pastagem, visto que nos topos das populações existiam pequenos fragmentos de florestas das quais possivelmente contribuíram para o processo de regeneração natural daquelas populações através do efeito fundador.

Do mesmo modo, Ritter et al. (2012) constatou que as heterozigosidades médias esperadas foram maiores que as observadas, em população de *Q. grandiflora*, encontrando um excesso de homozigotos na população devido a presença de alelos nulos detectados, processo de autofecundação e acasalamento preferencial, verifica-se que estes dados corroboram com os resultados obtidos para o presente estudo.

Angrizani (2008), em estudos com a espécie *Aniba rosaeodora* em duas populações naturais localizadas no estado de Manaus, detectou desvios significativos das expectativas genotípicas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os nove locos microsatélites analisados, devido essencialmente ao déficit de heterozigotos. Em seu estudo o autor conclui que a presença de alelos nulos associado ao acasalamento entre indivíduos aproximados são os fatores que explicam este déficit de heterozigotos.

Mendes (2009) avaliando populações de *Cedrela fissilis* Vell., encontrou valores de heterozigosidades médias esperadas maiores que as observadas, tal fato foi atribuído à ocorrência de endogamia, ou seja, cruzamentos entre indivíduos aparentados, este resultado é similar aos dados obtidos no estudo em questão.

Souza (2010) em seu estudos em populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb., amostradas em Floresta Paludosa, observou que a heterozigosidade observada (H_o) foi menor que a esperada (H_e), demonstrando que existe um excesso de indivíduos em homozigose nas populações. O autor atribuiu este resultado ao fato de que as áreas amostradas eram representadas por pequenos fragmentos, mantendo, assim, suas populações mais isoladas e conseqüentemente favorecendo o cruzamento entre indivíduos aproximados, o que segundo o autor resultou no aumento da homozigosidade e redução da heterozigosidade.

Em relação aos valores de heterozigosidade observa e esperada, resultados semelhantes foram também encontrados para outras espécies arbóreas, como pode ser observado para a maioria dos estudos listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação das características de locos microssatélites isolados para espécies arbóreas. A: média de alelos por loco, Ho: Heterozigosidade média observada, He: Heterozigosidade média esperada e respectivos autores.

Espécie	A	Ho	He	Referências
<i>Swietenia humilis</i>	9,7	0,41	0,55	White e Powell (1997)
<i>Symphonia globulifera</i>	14,6	0,79	0,85	Aldrich et al. (1998)
<i>Caryocar brasiliense</i>	16,0	0,73	0,83	Collevatti et al. (1999)
<i>Dinizia excelsa</i>	11,6	0,53	0,75	Dick & Hamilton (1999)
<i>Dicorynia guianensis</i>	6,9	0,58	0,62	Latouche-hallé et al. (2002)
<i>Swietenia macrophylla</i>	15,5	0,73	0,84	Lemes et al. (2002)
<i>Ceiba pentandra</i>	14,0	0,68	0,84	Brondani et al. (2003)
<i>Oenocarpus bacaba</i>	9,6	0,62	0,80	Lepsch-Cunha et al. (2003)
<i>Manilkara huberi</i>	6,43	0,68	0,81	Azevedo et al. (2005)
<i>Sextonia rubra</i>	15,6	0,74	0,82	Veron et al. (2006)
<i>Tabebuia aurea</i>	18,7	0,58	0,91	Braga et al. (2006)
<i>Quale grandiflora</i>	6,1	0,49	0,81	Ritter et al. (2012)

Fonte: Autora.

No presente estudo a maioria dos locos apresentaram os valores do Índice de Fixação (F) altos e positivos, sendo significativamente diferente de zero ($p < 0,01$) (Tabela 9), indicando excesso de homozigotos e deficiência de heterozigotos, como demonstrado pelos valores de (Ho), com exceção para os locos A1-20 (-0,1921) e A1-39 (-0,0213) que se mostraram negativos, indicando excesso de heterozigotos (WRIGHT, 1965). A média dos locos para a população I foi 0,390 e para a população II foi 0,328.

Ritter et al. (2012) para *Q. grandiflora* encontrou uma média de 0,388 para o índice de Fixação (F), indicando a presença de endogamia na população, resultado semelhante foi encontrado no presente estudo.

Para Salustio et al. (2008) os altos valores de endogamia em contraste aos baixos valores de heterozigosidade observada, indicam variabilidade restrita da espécie, sugerindo fluxo gênico restrito com predominância de autocruzamentos ou cruzamentos entre indivíduos

aparentados. Esta mesma hipótese tem sido usada por outros autores para explicar altos níveis de endogamia em outras espécies arbóreas (CARNEIRO et al., 2007; BITTENCOURT & SEBBENN, 2007; BITTENCOURT & SEBBENN, 2008).

Segundo García de León et al. (1997), comumente em microssatélites, os principais responsáveis por deficiência de heterozigotos, são (i) a existência de alelos nulos, (ii) acasalamentos preferenciais e (iii) autofecundação. Provavelmente para este trabalho, as combinações de existência de alelos nulos e acasalamentos entre indivíduos aparentados sejam a causa mais plausível pelo déficit de heterozigotos e, conseqüentemente, dos desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O valor médio do PIC foi de 0,608 para a população I e 0,566 para a população II (Tabela 9). Botstein et al. (1980) definiram a PIC como um indicador de qualidade do iniciador do marcador estudado. Segundo os mesmos autores, os marcadores serão considerados altamente informativos, quando apresentarem PIC superior a 0,50; razoavelmente informativos, quando possuírem valores entre 0,25 e 0,50; e, levemente informativos, os que obtiverem valores inferiores a 0,24. Neste contexto, no presente estudo mais de 70% dos iniciadores usados foram considerados com um alto valor de informatividade.

Tabela 9- Resultados dos parâmetros genéticos dos 7 marcadores microssatélites. F= Índice de Fixação e PIC= Conteúdo Médio de Informação Polimórfico.

Locos Parâmetros	A1-10	A1-15	A1-20	A1-26	A1-33	A1-35	A1-39	Média
F (pop I)	0,591	0,289	-0,192	0,685	0,862	0,333	0,167	0,390
F (pop II)	0,224	0,236	0,066	0,655	0,640	0,498	-0,021	0,328
PIC (pop I)	0,470	0,717	0,715	0,572	0,415	0,637	0,726	0,608
PIC (pop II)	0,572	0,465	0,729	0,491	0,568	0,561	0,578	0,566

Fonte: Autora.

O dendrograma das distâncias genéticas baseado em dados SSRs foi gerado pelo método UPGMA para os indivíduos de cada população. A Figura 7 apresenta o dendrograma

obtido nesta análise a partir dos dados moleculares para a população I. Pela estruturação visualizada por meio do dendrograma foi possível definir nove agrupamentos, considerando uma distância de ligação média de 74,65%. Cruz (1990) recomenda que o corte seja feito onde possa ser observada mudança brusca de nível.

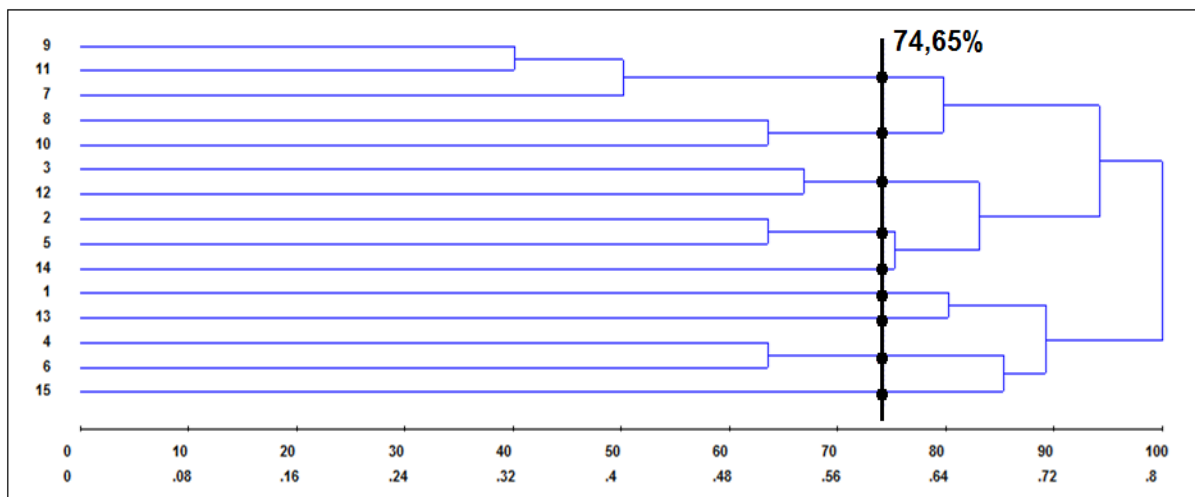


Figura 7- Resultado do dendrograma dos 15 indivíduos da população I, pelo método de agrupamento UPGMA. A linha vertical representa o ponto de corte em aproximadamente 74,65% considerando a distância de ligação média. **Fonte:** Autora.

Pelos resultados obtidos nos dendrograma os genótipos 1 e 2 apresentaram a mais alta dissimilaridade, com coeficiente igual a 0,816 (81,6%), outro par de genótipo (9 e 11) foram identificados como os menos dissimilares, apresentando um coeficiente igual a 0,324 (32,4%). O agrupamento com o método UPGMA reuniu no grupo 1 três indivíduos, sendo este considerado o maior dentre os agrupamentos deste estudo, já os grupos 5, 6, 7 e 9 apresentaram o menor número de indivíduos, com apenas um.

Na população II, foi possível identificar um ponto de corte em aproximadamente 65,53% considerando a distância de ligação média. De acordo com o ponto de corte estabelecido foi possível verificar a formação de sete agrupamentos (Figura 8).

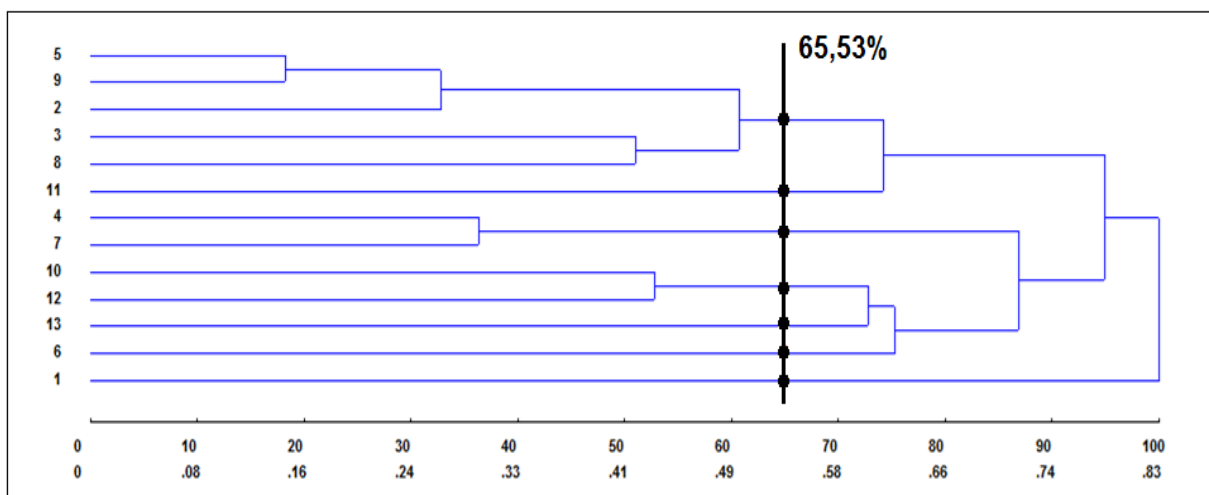


Figura 8- Resultado do dendrograma dos 13 indivíduos da população II, pelo método de agrupamento UPGMA. A linha vertical representa o ponto de corte em aproximadamente 65,53% considerando a distância de ligação média. **Fonte:** Autora.

De acordo com os resultados os genótipos 1 e 2 foram identificados como os mais dissimilares, com coeficiente igual a 0,835 (83,5%), enquanto que os indivíduos 5 e 9 foram classificados como os menos dissimilares, com coeficiente igual 0,152 (15,2%).

O dendrograma construído considerando todos os indivíduos de cada população (pop I e pop II) refletem a alta variabilidade genética entre os indivíduos amostrados dentro de cada população. Estes dados sugerem que está alta variabilidade genética observada entre os indivíduos pode ser explicada pelo tipo de polinização que essa espécie produz (FANG et al., 2000; PINTO et al., 2002b).

Após a aplicação de agrupamento UPGMA, foi obtido o Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), o valor para a população I foi 0,65. Segundo Sokal e Rohlf (1962) somente valores de correlação cofenética superiores a 0,80 indicam bom ajuste entre as matrizes originais e as distâncias gráficas, para a população II o valor do coeficiente de correlação cofenética foi elevado (0,82), isso mostra que há uma boa representação das matrizes de similaridade na forma de dendrograma (CRUZ, FERREIRA & PESSONI, 2011).

5.4 ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL

A divergência genética obtida neste estudo através das estimativas de (G_{ST}) para as populações de *V. bifalcata* como estimador do grau de subdivisão das populações foi de

0,079. Com base na definição de Wright (1978) verifica-se que existe uma diferenciação genética moderada entre as populações, onde possivelmente a deriva genética tenderá a causar diferenciação das frequências alélicas das populações, enquanto que o fluxo gênico causará a homogeneização (HARTL & CLARCK, 2010).

Segundo Hamrick & Godt (1990), os estudos realizados com espécies arbóreas têm evidenciado que o histórico de vida e as características ecológicas das espécies refletem na variação intra e interpopulacional e na heterogeneidade de suas populações. De modo geral, as espécies arbóreas apresentam maior nível de diversidade genética dentro de populações que entre populações.

Pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base nos dados de sete locos polimórficos verificou-se que 7,13% da variabilidade genética foi encontrada entre as populações e 92,86% dentro de populações, com valores significativos altos ($p < 0,001$). Adicionalmente ao índice G_{ST} , a AMOVA confirmou que a maior parte da variabilidade genética encontrada é devido às diferenças entre indivíduos dentro das populações.

O resultado obtido por meio da AMOVA corroboram com o resultado estimado pelo o índice G_{ST} (0,079) abordado no tópico acima, confirmando que a diferenciação entre as populações em estudo é considerada moderada pelos critérios sugeridos por Wright (1978), sugerindo que as populações estudadas estão moderadamente subdivididas.

Mangaravite (2012), analisando a diversidade genética da espécie *Cedrela fissilis* (Meliaceae) amostrados em sete populações naturais localizadas no oeste do Cerrado, utilizando a técnica de marcadores microsatélites também observou elevada variação genética dentro de população (94,39%) e (5,61%) entre as populações. Segundo o mesmo autor os dados obtidos por meio da AMOVA corroboraram com os dados estimados com o índice G_{ST} (0,058).

Vasconcelos (2011) em seu estudo de diversidade genética de *Myrciaria floribunda* por meio de marcadores microsatélites em paisagens fragmentadas da Serra da Mantiqueira, MG, observou que maior parte da diversidade genética ocorreu dentro das populações, havendo pouca divergência genética entre elas, o que foi verificado pelo G_{ST} e AMOVA. Segundo o mesmo autor este resultado de distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi concordante com alguns trabalhos realizados com espécies arbóreas (EUGUIARTE et al., 1992; MORAES, 1992).

A ausência de estruturação genética entre as populações de *V. bifalcata* foi confirmada pelo programa STRUCTURE. As estatísticas de Evanno et al. (2005) mostraram que o número de populações que melhor explica os dados é $K = 2$ (Figura 9).

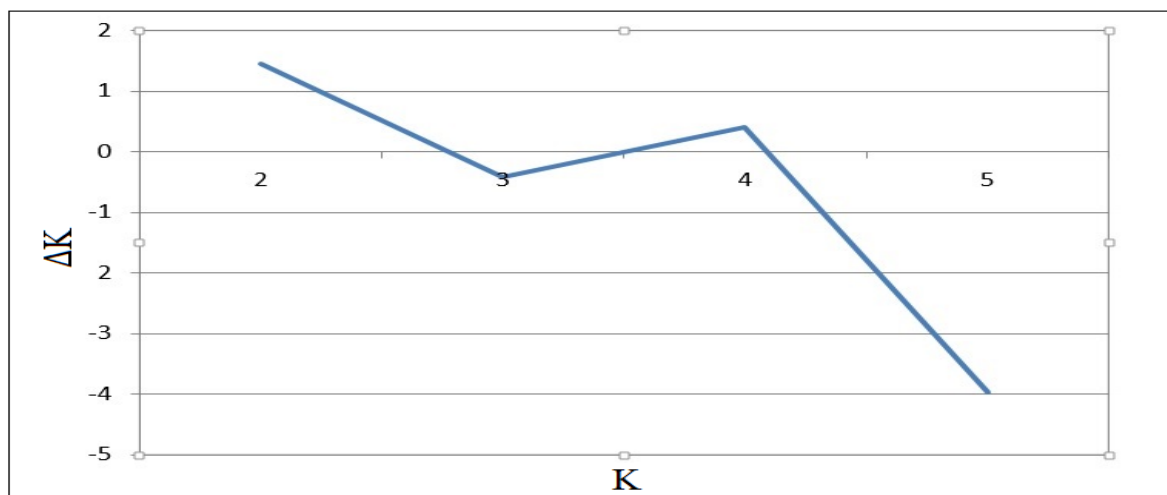


Figura 9- Valores de ΔK para cada valor de K , calculado de acordo com Evanno et al. (2005). O maior valor de K corresponde ao K ótimo. **Fonte:** Autora.

O gráfico de barras resultante da análise Bayesiana realizada com o programa STRUCTURE, com $k=2$ está representado na figura 10. Esta análise caracteriza o processo de migração dos alelos entre as duas populações. Ao analisar a figura, verifica-se o quanto dos alelos estão sendo compartilhados, afirmando os resultados obtidos através da análise de fluxo gênico.

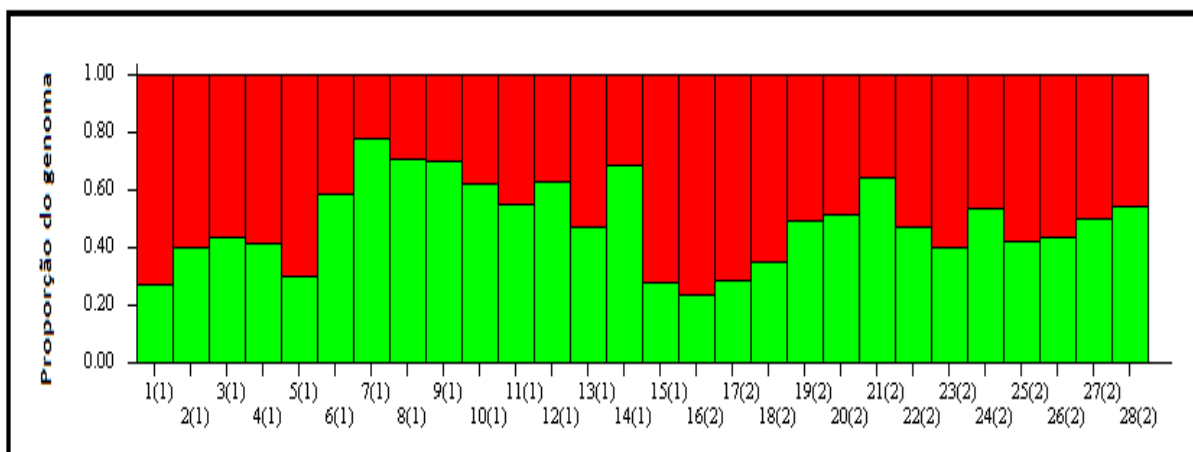


Figura 10- Análise Bayesiana de 28 indivíduos de *V. bifalcata* ocorrentes em duas populações nativas do Parque Nacional do Caparaó, baseada em sete locos de microssatélites. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a proporção do genoma compartilhado com cada grupo; (1):pop I e (2) popo II. **Fonte:** Autora.

Estimado com base na estatística F, o dado referente ao fluxo gênico obtido neste estudo foi de $N_m = 2,885$ (valor com base no número de migrantes por geração). Govindajaru (1989) distinguiu três níveis de fluxo gênico: alto (N_m acima de 1), intermediário (N_m entre 0,25 e 0,99) e baixo (N_m abaixo de 0,25). De acordo com esta definição o fluxo gênico encontrado neste estudo foi considerado alto o suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética.

Segundo Slatkin (1995), se o fluxo gênico é considerado alto, as populações evoluem de maneira conjunta, entretanto, se o fluxo for baixo as populações começam se divergir, o que poderia favorecer o estabelecimento de linhagens independentes. Ballooux & Lugon-Moulin (2002) ressaltam que o fluxo gênico é considerado a matéria prima que determina a evolução entre duas populações, pois, quando um indivíduo migra de uma população para outra, ele carrega genes que são representativos de sua população ancestral para a população receptora. Caso ele tenha sucesso em seu estabelecimento e realize cruzamentos, ele irá transmitir esses genes entre as populações, ocasionando a homogenização entre elas (RIDLEY, 2006).

Segundo Negrelle (1998) o tipo preferencial de dispersão de frutos e sementes da espécie *V. bifalcata* é a disseminação anemocórica, ou seja, causada pelo vento. Mediante o contexto, uma possível explicação para a similaridade entre as duas populações está relacionada com a distância geográfica entre elas que não impediu o fluxo gênico, visto que ambas populações estão localizadas no mesmo município encontrando-se em uma distância aproximada de 2,65 Km o que provavelmente facilitou a dispersão das sementes e pólen. A existência de uma crista montanhosa de 1.900 m de altitude também não foi capaz de impedir o fluxo gênico entre as duas populações. As formas de dispersão de sementes e de pólen constituem os componentes que determinam o fluxo gênico em plantas (LOVELESS & HAMRICK, 1986). O fluxo estimado neste trabalho não deve ser considerado contemporâneo, mas baseado na história genética destas populações.

Estes valores de diversidade genética demonstram que as populações apresentam um grande potencial para a conservação genética *in situ* e podem ser utilizadas como fonte de material genético (sementes) para a conservação.

5.5 ATRIBUTOS QUÍMICOS DOS SOLOS

Na Tabela 10 é apresentado os dados dos atributos químicos do solo das duas populações analisadas nesta pesquisa sob a Floresta Ombrófila Densa Montana. Nota-se diferenças significativas em vários atributos químicos do solo entre as populações analisadas.

Tabela 100 - Teores dos atributos químicos do solo coletados de duas populações nativas de *V. bifalcata* na Floresta Ombrófila Densa no Parque Nacional do Caparaó, ES, nas profundidades 0-5, 5-10 e 10-20 cm localizadas no PARNA.

	Camada	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	C _{org}	MO	CTC(t)	CTC(T)	SB	V	m
	cm	H ₂ O	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³				g kg ⁻¹		cmol _c dm ⁻³			%	
pop1	0-5	4,10a	1,74a	27,83b	4,50a	0,85a	0,33a	2,32a	32,11a	70,28a	121,16a	3,60a	33,39a	1,28a	4,09a	64,78a
pop2	0-5	4,16a	1,66a	42,16a	6,16a	0,68a	0,36a	1,88b	22,43b	48,21b	83,11b	3,60a	23,61b	1,18a	5,03a	64,58a
MÉDIAS - PROFUNDIDADE (5-10)																
	Camada	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	C _{org}	MO	CTC(t)	CTC(T)	SB	V	m
	cm	H ₂ O	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³				g kg ⁻¹		cmol _c dm ⁻³			%	
pop1	5-10	4,11a	1,26a	23,83b	4,16a	0,55a	0,22a	2,19a	26,48a	47,19a	81,36a	3,05a	27,35a	0,86a	3,25a	71,61a
pop2	5-10	4,35a	1,15b	31,66a	5,50a	0,39a	0,20a	1,67b	17,89b	37,58b	64,80a	2,37b	18,60b	0,70a	3,64a	73,18a
MÉDIAS - PROFUNDIDADE (10-20)																
	Camada	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	C _{org}	MO	CTC(t)	CTC(T)	SB	V	m
	cm	H ₂ O	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³				g kg ⁻¹		cmol _c dm ⁻³			%	
pop1	10-20	4,15 a	1,81a	27,33a	5,50a	0,46a	0,14a	2,05a	23,14a	39,65a	68,37a	2,75a	23,84a	0,70a	2,99a	73,97a
pop2	10-20	4,35a	1,44b	27,16a	5,16a	0,27a	0,12a	1,55b	16,68a	34,46a	59,42a	2,03b	17,17b	0,48a	2,80a	77,11a
MÉDIA GERAL DAS PROFUNDIDADES: (0-5, 5-10, 10-20)																
pop1	0-5, 5-10, 10-20	4,12	1,60	26,33	4,72	0,62	0,23	2,19	27,24	52,37	90,30	3,13	28,19	0,95	3,44	70,12
pop2	0-5, 5-10, 10-20	4,28	1,42	33,66	5,61	0,45	0,23	1,70	19,00	40,08	69,11	2,49	19,79	0,79	3,83	71,62

pH= potencial hidrogeniônico; P= fósforo; K= potássio; Na= sódio; Ca= cálcio; Mg = magnésio; Al= alumínio; H+Al= acidez potencial; C org= carbono orgânico; MO= matéria orgânica; CTC(t) = capacidade de troca catiônica efetiva; CTC (T)= capacidade de troca catiônica potencial; SB= soma de bases; V= saturação por bases; m= saturação por alumínio. As médias seguidas pela mesma letra em minúsculo, não diferem entre si pelo teste de U de Mann-Whitney, já as médias seguidas de outra letra diferem entre si pelo teste de U de Mann-Whitney. **Fonte:** Autora.

O pH não diferiu significativamente entre os conjuntos de camadas (0-5; 5-10 e 10-20 cm) nas duas populações em estudo (pop I e pop II), apresentando valores médios de 4,12 e 4,28, respectivamente. Os valores de pH em ambas as populações e profundidades avaliadas são considerados agronomicamente baixos, sendo classificados como solos fortemente ácidos (EMBRAPA, 2013).

No estudo realizado por Benites et al. (2010), o pH nos solos da Floresta Ombrófila Densa Montana em Mata Atlântica em estágio avançado de sucessão em Bom Jardim (RJ), foi de 4,8. No entanto, em alguns casos, em floresta Ombrófila Densa Montana a literatura menciona valores ainda mais baixos entre 3,2 a 3,9 (OLIVEIRA et al., 2001; PINTO & MARQUES, 2003; MARTINS, 2010).

Castro (2014) em seu estudo de caracterização dos atributos químicos do solo sob uma Floresta Ombrófila Densa Montana no PARNA, observou valores baixos de pH para todas as profundidades analisadas (0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm), os valores oscilaram entre 3,70 a 4,80 associado a altos valores de Al. O autor evidenciou que os solos são ácidos por natureza, dados os baixos valores do pH, sendo este valor encontrado em sua maior parte inferiores a outros estudos que utilizaram vegetações nativas.

O pH ácido dos solos analisado neste estudo possivelmente encontra-se relacionado com o processo de lixiviação, o qual tende a acidificar os solos através da remoção das bases existentes. Os solos florestais apresentam alta pluviosidade, onde a lixiviação é considerada mais intensa, de forma a ocasionar maiores perdas de bases do solo (TROEH & THOMPSON, 2007).

Os valores de Al apresentaram diferença significativa entre as duas áreas de estudo, tendo seus valores variando entre 2,05 a 2,23 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$, com média de 2,18 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ para a população I e entre 1,55 a 1,88 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$, com média de 1,70 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$, para a população II. De acordo com faixas estabelecidas por Prezotti et al. (2007), o Al é considerado alto ($>1,0 \text{ cmol}_c \text{dm}^{-3}$), em ambas populações e para todas as profundidades.

As plantas que ocorrem nesse ambiente possuem diversas estratégias para se desenvolverem sob altos teores de alumínio livre. As espécies pertencentes a família Vochysiaceae são reconhecidamente acumuladoras de alumínio ao ponto de serem consideradas alumínio-dependentes, das quais sobrevivem apenas em solos com a presença

desse metal (FURLEY & RATTER, 1988), apresentando vantagem adaptativa em relação às demais, podendo ocorrer em solos pobres em minerais e de baixo pH, como os do Brasil Central (HARIDASAN 1982; HARIDASAN & ARAÚJO 1988).

A espécie *V. bifalcata* é considerada alumínio-dependente (FURLEY & RATTER, 1988), adaptando-se melhor em solos com maior concentração de alumínio, sendo está uma explicação plausível para a predominância desta espécie na área em estudo.

No presente estudo este elevado valor de Al encontrado está diretamente relacionado com os baixos valores de pH presente em ambas populações, pois a adição de ácido ou de um mineral formador de ácido abaixa o pH do solo (PREZOTTI et al., 2007) consequentemente solos ácidos podem conter níveis tóxicos de Al, podendo estes causar pelo menos dois tipos de efeitos negativos no crescimento das plantas, como o excesso de Al inibe rapidamente o alongamento das raízes e também inibe a síntese de DNA (RONQUIM, 2010).

A acidez potencial apresentou diferenças entre as áreas estudadas, apresentando valores que se diferenciaram significativamente entre as duas populações para as profundidades de (0-5 e 5-10 cm). Em ambas populações os valores de H+Al decresceram à medida que a profundidade aumenta.

Segundo a proposta estabelecidas por Prezotti et al. (2007), a H+Al é considerado alto ($> 5,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), em ambas populações e para todas as profundidades, pois a acidez potencial está diretamente relacionada com o teor de matéria orgânica do solo.

A vegetação local influencia o pH do solo de forma complexa porque ela produz matéria orgânica. A adição de MO decomposta ao solo resulta na formação de ácidos orgânicos o que consequentemente reduz o pH do solo contribuindo para o aumento dos valores de H+Al (TROEH & THOMPSON, 2007). De acordo com Skorupa et al. (2012), os elevados teores de MO do solo contribuem para o baixo valor do pH e para os elevados valores de H+Al.

Skorupa et al. (2012) analisaram os atributos químicos do solo em diversas fisionomias no estado de Minas Gerais, tais como: Floresta Estacional Decidual Terra Firme (n=18); Floresta Estacional Semidecidual (n=109); Floresta Estacional Semidual Ciliar (n=33); Floresta Estacional Decidual Ciliar (n=3) e Floresta Ombrófila Densa Montana (n=64), observam menores valores de pH e maiores de Al trocável e acidez potencial em

Floresta Ombrófila Densa, os autores atribuíram este resultados ao grande acúmulo de MO encontrado em ambos fisiomas, que consequentemente favoreceu na redução do pH e aumento dos valores de Al e acidez potencial.

No presente estudo, a acidez dos solos representada pelos atributos pH em água e H+Al, evidencia que os solos das duas populações são tidos como ácidos por natureza, dados os baixos valores do pH e a elevada acidez potencial.

Em condições naturais, a acidez do solo pode ser justificada pelo material de origem, pelo intemperismo em suas diversas formas. Para ambientes onde a pluviosidade é elevada, situação da área de estudo, a lixiviação de bases e acúmulos de ácidos intensifica essa acidificação (SOUSA, MIRANDA & OLIVEIRA, 2007).

Em estudo realizado por Scheer et al. (2011) para caracterização dos atributos químicos do solo sob Floresta Ombrófila Densa Montana pertencente ao estado do Paraná, foram observados os seguintes valores para as profundidades de 0-5; 5-10; 10-20 e 20-40 cm: pH oscilou entre 3,4 e 4,2; H+Al estabeleceu-se entre 15,0 a 32,8 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$; e Al entre 1,8 a 2,8 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$, evidenciando que os baixos valores de pH associado a valores altos de H+Al e Al, contribuíram para a predominância dos solos ácidos existente na Floresta. Resultado similar foi encontrado para o presente estudo também sob Floresta Ombrófila Densa Montana no estado do Espírito Santo.

A toxidez por Al aparece para ambas populações e profundidade, apresentando valor de saturação por alumínio (m%) acima de 50%, todos acompanhados de baixa saturação por bases (V% abaixo de 12%).

O índice V representa a razão percentual entre SB ($\text{K} + \text{Ca} + \text{Mg}$) e T. Quando $V < 50\%$, o solo é classificado como distrófico, visto que suas argilas são de baixa atividade de troca iônica. O índice V obtido nesse estudo caracteriza o solo em todas as profundidades e populações (pop I e pop II) como distrófico, apresentando seus valores de V menores que 50% associado a altos valores de m (COSTA et al., 2008).

Quanto à fertilidade do solo do presente estudo, o mesmo pode ser considerado pobre no teor de nutrientes para ambas populações, apresentando baixos valores de saturação de bases (V) associados a altos valores de saturação por alumínio (m) (EMBRAPA, 2013). Estes dados corroboram com a proposta definida por Prezotti et al. (2007), onde os valores de

saturação de base (V) menores que 50 % são classificados como baixo ($< 50\%$) e valores de saturação por alumínio (m) maiores que 40% são considerados altos ($> 40\%$). Ambos atributos ((V) e (m)) não apresentaram diferenças significativas para as duas populações em estudo (pop I e pop II) e em todas as profundidades.

Segundo Gama-Rodrigues et al. (2007), a baixa fertilidade dos solos de florestas tropicais é compensada pela eficiente ciclagem de nutrientes do material aportado. De acordo com Cardoso et al. (2011), a decomposição do material vegetal mais uniforme está relacionada com o material aportado mais diversificado. Vitousek (1986) afirma que, mesmo com a grande quantidade de serapilheira nos ecossistemas naturais, há baixa fertilidade dos solos, em consequência da rápida decomposição do material e a maior acidez desses solos.

De acordo com a classificação proposta por Prezotti et al. (2007), verifica-se que nas duas áreas (pop I e II) os teores de P encontram-se abaixo dos limites ideais, que é de 5 mg dm^{-3} . Os valores de P apresentaram diferenças significativas entre as camadas de (5-10 e 10-20 cm), no entanto, para a camada de (0-5 cm) não houve diferença entre as duas populações (pop I e pop II).

O presente estudo revela que os teores médios de P encontrados ($1,60$ e $1,42 \text{ mg dm}^{-3}$) para a população I e II, respectivamente, assumem valores abaixo dos encontrados por Benites et al. (2010), onde os autores avaliaram os atributos químicos do solo de Mata Atlântica sob diferentes tipos de uso (mata; cultivo; café e pastagem), no Município de Bom Jardim RJ, nas camadas de 0-5; 5-10; 10-20 e 20-40 cm, encontrando um valor médio de P de $4,2 \text{ mg dm}^{-3}$ para o local de estudo predominante de mata.

Os teores de K encontram-se muito baixo para ambas populações ($< 60 \text{ mg dm}^{-3}$), o que pode ser explicado pelo fato do mesmo se percolar facilmente no perfil do solo juntamente com a água da chuva e por ser fracamente retido no solo, pois, a medida que o solo sofre lixiviação e torna-se ácido o K total declina (ANDRADE et al., 2004).

De acordo com a classificação proposta no Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Espírito Santo (PREZOTTI et al., 2007), para ambas populações e para todas as profundidades observou-se baixos teores de Na ($< 20 \text{ mg dm}^{-3}$). Este baixo valor está relacionado com a mobilidade que este cátion possui, podendo este ser eliminado através da lixiviação, visto que as áreas de estudo são regiões que apresentam altos níveis pluviométricos (TROEH & THOMPSON, 2007).

O valor de Ca ($< 1,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), de Mg ($< 0,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) encontraram-se em níveis baixos. Os solos ácidos apresentam baixas concentrações de bases, especialmente cálcio e magnésio, apesar da ocorrência generalizada destes elementos em diversos materiais de origem do solo. A relação Ca/Mg é importante, pois eles competem pelos sítios de adsorção no solo, havendo preferência pelo cálcio, em relação ao magnésio, no complexo de troca do solo (SALVADOR et al., 2011). Esse fato explica os maiores teores de Ca em relação ao Mg nos pontos amostrados e também nas tabelas de referência utilizadas.

Neste estudo os valores médios de Ca para a população I foi de $0,62 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e para a população II foi de $0,45 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, em relação aos teores de Mg, os valores médios obtidos para ambas populações foram de $0,23 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. Benites et al. (2010), em seu estudo em área de Mata Atlântica sob solos da Floresta Ombrófila Densa Montana em Bom Jardim (RJ), encontraram valores de Ca e Mg superiores a esta pesquisa. Para estes autores os valores médios observados de Ca foram de $1,2 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e de Mg foram de $1,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$.

De acordo com Troeh & Thompson (2007), a quantidade de Ca e Mg presentes no solo declinam à medida que o solo se torna mais ácido, que são típicos do território brasileiro. Teores baixos de Ca e Mg ocorrem em solos altamente lixiviado, especialmente em solos tropicais.

A capacidade de troca de cátions (CTC) de um solo consiste no intercâmbio de cátions adsorvidos em superfícies carregadas e cátions na solução do solo. O valor da CTC efetiva foi classificado como médio ($2,5 - 6,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) segundo a proposta realizada por Prezotti et al. (2007). Um valor médio de CTC indica que o solo tem capacidade média para reter cátions em forma trocável.

Ao interpretar os resultados da CTC efetiva (t) e CTC potencial (T), verifica-se que os mesmos corroboram com os atributos químicos anteriormente discutidos. Ambas decrescem com a profundidade, verifica-se que o pH baixo (acidez elevada) propicia a baixa disponibilidade de bases solúveis e, inversamente, eleva a disponibilidade de Al. Assim, a saturação por Al demonstra que boa parte da CTC é ocupada pelo Al trocável, bem como a existência de elevados teores de MO é responsável pela geração da maioria das cargas negativas do solo (SIMAS et al., 2005).

Os valores médios de carbono orgânico e os valores médios de matéria orgânica presente no solo da Floresta em estudo, foram considerados superiores a diversos estudos em outras fisionomias florestais nativas em diferentes regiões do Brasil (SIMAS et al., 2005).

O carbono orgânico apresentou valores médios superiores nas primeiras camadas em ambas populações, este comportamento provavelmente é explicado em função do teor mais alto de matéria orgânica que, geralmente, ocorre nas camadas superficiais do solo, associado à presença da serapilheira.

O estoque de carbono foi maior nos solos da população I, possivelmente em função do maior aporte de matéria orgânica presente. Barreto (2005) afirmou que a redução no aporte de carbono na camada superior, pode ser promovida pela diminuição da adição de resíduos vegetais, condições que favoreçam o aumento da atividade microbiana, pelas perdas devido à erosão, entre outros fatores.

Numa comparação por média simples, as médias da matéria orgânica apresentaram-se distintas em relação as duas populações estudadas (pop I e pop II). A população I tende a maiores quantidades de matéria orgânica que os fragmentos de mata da população II, sendo a média da matéria orgânica da população I de 52,379 g kg⁻¹, contra 40,089 g kg⁻¹ da população II. À profundidade de 0-5 cm foi a que apresentou diferença significativa entre as duas populações, sendo está responsável pela diferenciação entre as médias de matéria orgânica entre as duas populações.

Teores de C_{org} e consequentemente os de MO, decresceram em profundidade em ambas populações. As CTCs efetiva e potencial também tem seus valores reduzidos com o aumento da profundidade.

Estudos em Floresta Ombrófila Densa demonstram que nesse tipo de vegetação, o aporte constante de material vegetal é um dos motivos pela manutenção de elevados teores de C_{org} no solo, associado às condições edafoclimáticas (FELLER & BEARE, 1997).

Em geral, a adição de MO no solo ocorre por meio da deposição de material senescente da parte aérea das plantas e pela liberação de exsudatos radiculares, e sua permanência no solo está relacionada com diversos fatores bióticos e abióticos (PILLON; MIELNICZUK & MARTIN NETO, 2002; MAFRA et al., 2008).

Nas florestas tropicais ocorre forte interação entre vegetação e solo, por meio da ciclagem de nutrientes, em que o acúmulo de serapilheira exerce importante função, por ser a mais significativa forma de transferência de nutrientes (GOLLEY et al., 1978). Isto é refletido no acúmulo de matéria orgânica, o que é claramente observado para as duas populações em estudo, no entanto, a população I possui maior aporte de matéria orgânica nos primeiros centímetros em relação a população II. Esta condição pode estar ligada ao tipo de genótipos presentes que compõem a formação florestal daquele local, que de maneira mais participativa contribuíram para maior acúmulo de matéria orgânica em superfície na população I.

Alguns estudos, como o de Jerep et al. (2002) e Telles et al. (2001) tem relatado a influência do ambiente em características das plantas, sugerindo uma adaptação dos genótipos às condições do ambiente. Telles et al. (2001) observaram que os fenótipos de árvores de *Eugenia dysenterica* são influenciados pelo tipo de solo onde a população se encontra, independentemente da sua distribuição espacial e da divergência genética, o que sugere um processo adaptativo ou uma resposta por norma de reação às variações ambientais nessas populações.

Corrêa (2007) afirma que a quantidade de matéria orgânica de uma área serve de base para inferências sobre a qualidade do solo e, por isso, tem sido amplamente utilizada em estudos de sistemas agrícolas, principalmente em comparação com ambientes naturais e que a mesma apresenta-se como um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de resíduos orgânicos de diversas naturezas e por uma transformação contínua sob ação de fatores biológicos, químicos e físicos.

6 CONCLUSÃO

Existe potencial de transferibilidade dos pares de *primers* de microssatélites para o mesmo gênero e outros gêneros, como no caso da *V. ferruginea* e *Q. grandiflora*.

Os *primers* desenvolvidos para *V. ferruginea* foram transferidos com sucesso para *V. bifalcata*, comprovando a conservação das regiões flangeadoras dos microssatélites e indicando o uso potencialmente amplo destes marcadores dentro do gênero.

Os *primers* desenvolvidos para espécie *Q. grandiflora* geraram produtos de amplificação satisfatórios, porém se mostraram monomórficos, não podendo ser utilizados para estudo de caracterização genética.

A diversidade genética entre as populações nativas de *V. bifalcata* foi classificada como moderada, sugerindo que as populações estudadas são moderadamente parecidas geneticamente.

O estudo revelou uma maior diversidade genética dentro das populações do que entre as populações, revelando que as populações são endogâmicas.

Há evidência de fluxo gênico histórico entre as populações de cada fragmento, indicando que as populações estudadas têm historicamente um processo de troca gênica importante.

Os atributos químicos do solo evidenciam que em ambas populações a fertilidade do solo é baixa e apresenta acidez elevada.

No presente estudo, a homogeneidade da fertilidade do solo, pode ser explicada pelas características edafoclimáticas semelhantes entre as duas populações.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de populações naturais ao longo das gerações demanda conhecimento sobre a variabilidade genética existente, assim como a compreensão dos padrões de distribuição desta variabilidade dentro e entre populações.

A utilização dos marcadores moleculares do tipo microssatélites vem crescendo nos últimos anos e se mostrado altamente vantajosos, atingindo seus propósitos de fornecer subsídios para programas de conservação e manejo.

Os resultados de amplificação heteróloga de *Vochysia ferruginea* para *Vochysia bifalcata* foram satisfatórios, sendo possível caracterizar sete pares de *primers* para loci de microssatélites. A caracterização destes marcadores terá um importante papel nos estudos sobre diversidade genética da espécie.

Os dados adquiridos no presente estudo geram informações importantes sobre a variabilidade genética existente entre os indivíduos de *V. bifalcata* e da fertilidade do solo. Os resultados demonstram que as populações amostradas apresentam potencial para conservação genética *in situ*, comprovando a importância do Parque Nacional do Caparaó para fins conservacionistas.

REFERÊNCIAS

- ACHARD, F.; EVA, H.D.; STIBIG, H.J.; MAYAUX, P.; GALLEGOS, J.; RICHARDS, T.; MALINGREAU, J.P. Determination of deforestation rates of the world's humid tropical forests. **Science**. v.297, p.999-1002, 2002.
- ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P & KOCHERT, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, 7(8): 933-944.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C., GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 1-18, 2013.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandifolium* (Wil. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 159p, 2007.
- ANDRADE, E.M.; D'ALMEIDA, D.M.B.A.; MEIRELES, A.C.M.; LEMOS FILHO, L.C.A.; ARRUDA, F.E.R. Evolução da concentração iônica da solução do solo em áreas irrigadas na Chapada do Apodi, CE. **Revista Ciência Agronômica**, 35: 9-16, 2004.
- ANGRIZANI, C.R. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores de DNA microssatélites para *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae): uma espécie florestal amazônica ameaçada**. Dissertação (mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Amazonas, 2008
- ANMARKRUD, J.A.; KLEVEN, O.; BACHMANN, L.; LIFJELD, J.T. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. **BMC Evolutionary Biology**. 2008.
- ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. Uberlândia. **Bioscience Journal**. v.23, n.3. p. 66-75, 2007.
- ARAÚJO, E. A.; KER, J. C.; NEVES, J. C. L.; LANI, J. L.; Qualidade do solo: conceitos, indicadores e avaliação. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.5, n.1, p.187-206, 2012.
- ASHWORTH, L.; AGUILAR, R.; GALETTO, L.; AIZEM, M.A. Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation? **Journal of Ecology**, London, v. 92, p. 717-719, 2004.
- APG III. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III**. Bot. J. Linn. Soc. 161, 105–121. 2009.
- AXELROD, D. I. **Mesozoic paleogeography and early angiosperm history**. The Botanical Review 36: 277-319. 1970.

AZEVEDO, V.C.R.; VINSON, C.C. E CIAMPI, A.Y. 2005. Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. **Molecular Ecology** Notes, 5:13–15.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**. v. 11, p. 155-16, 2002.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations.** *Molecular Ecology*, v.16, p.3759–3767, 2007.

BARRETO, R da C. **Acumulação de carbono e emissões de gases do efeito estufa em solos sob diferentes tipos de manejo e floresta, Londrina – PR.** Niterói, 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Geociências – Geoquímica Ambiental) – Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

BENITES, V.M.; MOUTTA, R.O.; COUTINHO, H.L.C.; BALIEIRO, F.C. Análise discriminante de solos sob diferentes usos em área de Mata Atlântica a partir de atributos da matéria orgânica. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 4, ago, 2010.

BERTONI, J. LOMBARDI NETO, F. **Conservação do solo.** São Paulo: Ícone, 1990.355p.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, Edinburg, v.99, p.580- 591, 2007.

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Pollen movement in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v.9, p.855-868, 2008.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares.** 2ª Ed. Viçosa, MG., 374p. 2009.

BORN, C.; HARDY, O. J.; CHEVALLIER, M. H.; OSSARI, S.; ATTÉKÉ, C.; WICKINGS, E. J.; HOSSAERT-MCKEY, M. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p. 2041-2050, 2008.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.** *American Journal of Human Genetics*, Baltimore, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRAGA, A.C.; REIS, A.M.M.; LEOI, L.T.; PEREIRA, R.W. & COLLEVATTI, R.G. 2006. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology** (?):?.

- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* e *E.urophylla*. **Theoretical and Applied genetics**, New York, v.97, p.816-827, 1998.
- BRONDANI, R.P.V.; GAIOTTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; KIRST, M.; GRIBEL, R. & GRATTAPAGLIA, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes** 3(2): 177-179.
- BUONAMICI, A.; CAVERS, S. E VENDRAMIN, G.G. 2008. Microsatellite loci isolated from the tropical tree *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae). **Molecular Ecology Resource**, OnlineEarly Articles.
- BUZA, L., YOUNG, A., THRALL, P. Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. **Biological Conservation**, v.93, p.177-186, 2000.
- CALLEN, D.F.; THOMPSON A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A. RICHARDS, R.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and Origin of "Null" Alleles in the (AC)_n Microsatellite Markers. **American Journal of Human Genetics**, 52:922-927, 2003.
- CARDOSO, E.L.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; FERREIRA, M.M.; FREITAS, D.A.F. Qualidade química e física do solo sob vegetação arbórea nativa e pastagens no Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Viçosa, v. 35 p. 613-622, 2011.
- CARVALHO, P. E. R. **Guaricica (*Vochysia bifalcata*)**. Circular Técnica 150. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circ-tec150.pdf>>. Acesso em: 17 nov 2014.
- CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES. S..B.; MORAES, M.L.T.; STRANGHETTI, V.; ALZATE-MARIN, A.L.; SEBBENN, A.M. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.4, p. 599-606, 2010.
- CASTRO, K. C. **Serapilheira e estoque de carbono ao longo de um gradiente altitudinal na floresta ombrófila densa, no Parque Nacional do Caparaó, ES**. Tese (Mestrado em Ciências Florestais), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro – ES, 2014.
- CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, New York, v.83, n.1, p.51-57, 1996.
- CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) Leguminosae – Caesalpinoideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa, 16).

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPALIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v.83, p.748-756, 1999.

COLLEVATTI, R. G.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C. Spatial Genetic Structure and life history traits in Cerrado tree species: Inferences for conservation. **Natureza & Conservação**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 54-59, 2010.

CORRÊA, R. M. **Avaliação de atributos de solos sob diferentes usos em perímetro irrigado do Vale do Rio São Francisco**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência do solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CORSINI, P.C.; FERRAUDO, A.S. Efeitos de sistemas de cultivo na densidade e macroporosidade do solo e no desenvolvimento radicular do milho em Latossolo Roxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.289-298, 1999.

COSTA, F. C.; ROSA, F. F.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. de C. **Amplificação cruzada de iniciadores em regiões microssatélites do genoma de *Eugenia klotzchiana* (BERG.) C.** Ciências Biológicas - 8. Genética - 4. Genética Molecular. 62ª Reunião Anual da SBPC. 2010. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/2816.htm>>. Acesso em: 14 out 2014.

COSTA, M. C. G.; FERREIRA, G. B.; ARAÚJO, A. M. **Apostila do curso de interpretação de análises de solo e recomendação de calagem e adubação no Estado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 188 p. 1990.

CRUZ, D. C.; FERREIRA, M. F.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG. Suprema, 620 p. 2011.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron. v35i3.21251>.

DANNER, M. A. et al. Estaquia semilenhosa de *Vochysia bifalcata*. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 6, p. 5, 2010.

DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of Microsatellites among Tropical Trees (Leguminosae). **American Journal of Botany** 84(12): 1658–1663, 1999.

DICK, C.W. & HAMILTON, M.B. 1999. Microsatellites from the Amazonian tree *Dinizia excelsa* (Fabaceae). **Molecular Ecology**, 8, 1753–1768.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison, Soil Science Society of America, v.35, p.3-22, 1994.

DOW, B. D.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. Characterization of highly variable (GA/CT) microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.91, p.137-141, 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*. 12: 13-15. 1990.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS)**, Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2º Ed. 2006. 316p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**, 3.ed. ver, ampl. Brasília, DF , 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro, RJ)**. Súmula da 10. Reunião Técnica de Levantamento de Solos. Rio de Janeiro, 1979. 83p

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA — EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**, 3.ed. ver, ampl. Brasília, DF , 2013.

EUGUIARTE, L.E.; PÉREZ-NASSER, N.; PINERO, D. Genetic structure, outcrossing rate, and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (topical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v.69, p.217-228, 1992.

EWERS, R.M.; DIDHAM, R.K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, Oxford, v.81, p. 117-142, 2006.

FELLER, C. & BEARE, M.H. **Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics**. *Geoderma*, 79:69-116, 1997.

FERES, J. M., MARTINEZ, M. L. L., MARTINEZ, C. A., MESTRINER, M. A., ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 434–437, 2009.

FRANÇA, F. **Vochysiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB250>>. Acesso em: 02 Fev. 2014.

FURLEY, P.A. & RATTER J.A. (1988). Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography**, 15: 97-108.

GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F.;COMERFORD, N.B. Biomass and nutrient cycling in pure and mixed stands of native tree species in Southeastern Bahia, **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Viçosa, n. 31, p. 287-298, 2007.

GANDARA, F.B. **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2004. p.111-163.

GARCÍA DE LÉON, F.J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Cicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology**, 6: 51-62.

GARCIA, R.A.V.; BRONDANI, C.; SILVA, H.T; BRONDANI, R.P.V. **Caracterização molecular e análise de transferibilidade de marcadores microssatélites em Leguminosas**. Anais.. IV de Pesquisa, Ensino e Extensão (UFG). Gois- GO, 2007.

GOLLEY, F.B. Nutrient cycling and nutrient conservation. In: Tropical forest ecosystems: structure and function. **Elsevier**; Amsterdam, p. 137-156, 1983.

GOMES, M.A.F., FILIZOLA, H.F. **Indicadores Físicos e Químicos de Qualidade de Solo de Interesse Agrícola**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 2006. Disponível em< [ttp://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Gomes_Filizola_indicadoresID-u1keja1HAN.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Gomes_Filizola_indicadoresID-u1keja1HAN.pdf) > acesso em 20 nov 2014.

GOMES RDE, C. et al. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **J Ethnopharmacol**, v. 121, n. 3, p. 466-71, Jan 30 2009

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. **Life in the Cerrado: a South American tropical seasonal vegetation**. Vol. 2. Pollination and seed dispersion. Reta Verlag, Ulm. 2006.

GOVINDAJARU, J. **Variation in gene flow levels among predominatly selfpollinated plants**. Journal of Evolutionary Biology, Malden, v. 2, p. 173-181. 1989.

GRATTAPAGLIA, D. **Marcadores moleculares para espécies florestais: Eucalyptus como modelo**. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p.967-993. 2001.

GUGERLI, F.; BRODBECK, S.; HOLDEREGGER, R. Insertions–deletions in a microsatellite flanking region may be resolved by variation in stuttering patterns. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 26, p. 255–262, 2008.

- GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 67, p. 123-135, abr. 2005.
- HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, n.10, p.1685-1693, 1991.
- HARIDASAN, M. **Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil**. Plant and Soil 65 (2): 265-273. 1982.
- HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G. M. **Aluminium-accumulating species in two forest communities in the cerrado region of Central Brazil**. Forest Ecology and Management 24:15-26. 1988.
- HARTL, D. L.; CLARCK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Artmed. 4ª ed. 660 p. Porto Alegre. 2010.
- HERBARIUM CATALOGUE. **Kew Databases**. Kew Royal Botanic Gardens. Disponível em: <http://apps.kew.org/herbcat/getImage.do?imageBarcode=K000565937>>. Acesso em: 02 dez 2014.
- HERDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Lancaster v.59, n.8, p.1633-1638, 2005.
- IBAMA. **Plano de Manejo Parque Nacional de Caparaó**. Brasília. 1996.
- IBAMA – ICMBio. **Relatório de ocorrências de incêndios em unidades de conservação federais**. Alto Caparaó, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL (IBDF). **Plano de manejo do Parque Nacional do Caparaó**. Brasília: IBDF-FBCN, 1981.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.11, p. 424-429, 1996.
- JEREP, F.C.; SILVA, D.C.G.; MEDRI, M.E.; RUAS, P.M.; RUAS,C.F.; MOREIRA, R.M.P.; GALLO,M.C.C. Tolerância ao alagamento e caracterização genética de populações de *Parapiptadenia rigida* Benth. Brennan (Leguminosae) nativas de mata ciliar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTIC, 48., 2002, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: [s.n.], 2002.
- JUMP. A.S.; PENUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, p. 8096-8100, 2006.
- KAISER, E.A.; MARTENS, R.; HEINEMEYER, O. Temporal changes in soil microbial biomass carbon in an arable soil. **Plant and Soil**, v.170, p.287-295, 1995.

KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.G.; HARRIS, R.F.; SCHUMMAN, G.E. Soil quality: A concept, definition and Framework for evaluation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, p. 4-10, 1997.

KAWASAKI, M. L. **Systematics of *Erisma* (Vochysiaceae)**. Memoirs of New York Botanical Garden 81: 1-40. 1998.

KEAY, R. W. J.; STAFLEU, F. A. ***Erismadelphus***. Acta Botanica Neerlandica 1: 594-599. 1953.

KIM, K.S.; MIN, S.; AN, J.H.; LEE, H. Cross -species amplification of Bovidae microsatellite and low diversity of the endangered Korean Goral. **Journal of Heredity**, v. 95, p. 521-525, 2004.

LATOUCHE-HALLÉ, C.; RAMBOER, A.; BANDOU, E.; CARON, H E DECROOCQ, S. 2002. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tropical tree species *Dicorynia guianensis* (Caesalpinaceae). **Molecular Ecology Notes**. 2: 228–230.

LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V. E GRATTAPAGLIA, D. 2002. Multiplexed Systems of Microsatellite Markers for Genetic Analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a Threatened Neotropical Timber Species. **The Journal of Heredity**, 93(4): 287-291.

LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C.A. & HAMILTON, M.B. 2003. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, 3(3): 435-437.

LEWIN, B. **Genes XII**. Porto Alegre: Artmed. 955p. 2001.

LIMA, D. M.; ALCANTARA, G. B.; BORTOLINI, M. F.; FANTI, F. P.; BIASI, L. A.; QUOIRIN, M.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Substratos e concentrações de ácido naftaleno acético no enraizamento de estacas semilenhosas de *Calliandra selloi* e *Calliandra tweediei*. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 105-111, 2006.

LITT, A.; CHEEK, M. ***Korupodendron songweanum*, a new genus and species of Vochysiaceae from West-Central Africa**. Brittonia 54: 13-17. 2002.

LITT, A.; STEVENSON, D. W. **Floral development and morphology of Vochysiaceae. I. The structure of the gynoecium**. American Journal of Botany 90 (11): 1533-1547. 2003.

LITT, M.; LUTY, J. A. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. American Journal Human Genetics, v. 44; p. 397-401, 1989.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 2, 352 p. 1998.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. **The influence of seed dispersal mechanisms on the genetics structure of plant population.** In: ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. (Eds.). *Fruitivores and seed dispersal*. Dordrecht: Junk Publishers. Cap. 17, p. 211-223. 1986.

LOWE, A. J.; GOODALL-COPESTAKE, W. P.; CARON, H.; KREMER, A.; DECROOCQ, S. **A set of polymorphic microsatellites for *Vochysia ferruginea*, a promising tree for land reclamation in the Neotropics.** *Molecular Ecology Notes*, v2(3), p.209-210, 2002.

MAFRA, A.L.; GUEDES, S.F.F.; KLAUBERG FILHO, O.; SANTOS, J.C.P.; ALMEIDA, J.A.; ROSA, J.D. Carbono orgânico e atributos químicos do solo em áreas florestais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 2, p. 217-224, 2008.

MAIA, S.M.F.; XAVIER, F.A.S.; OLIVEIRA, T.S.; MENDONÇA, E.S. & ARAÚJO FILHO, J.A. Impactos de sistemas agroflorestais e convencional sobre a qualidade do solo no semi-árido cearense. **Árvore**, 30:837-848, 2006.

MANGARAVITE, E. **Estrutura e diversidade genética no complexo *Cedrela fissilis* (Meliaceae) estimadas com marcadores microssatélites.** Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa- MG, 2012.

MARCANO-BERTI, L. **Vochysiaceae.** In Berry, P.E., Holst, B.K. & Yatskievych, K. (eds.). *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 9. Rutaceae - Zygophyllaceae. Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis. p. 500-524. 2005.

MARTÍNEZ, A.K.; GAITÁN-SOLIS, E.; DUQUE, M.C.; BERNAL, R. & TOHME, J. 2002. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology Notes**, 2: 408-410.

MARTINS, K.; SANTOS, J.D.; GAIOTTO, F.A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.1, p.61-69, 2008.

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, Estado de São Paulo.** 2010. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MAYWORM, M. A. et al. **Nutritional reserves of Vochysiaceae seeds: chemical diversity and potential economic uses.** *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, v. 83, n. 2, p. 523-31, Jun 2011.

MAYWORM, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S.; SALATINO, A. **Monomer composition of polysaccharides of seed cell walls and the taxonomy of Vochysiaceae.** *Phytochemistry* 55: 581-587. 2000.

MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), **Scientia forestalis**, n.66, p.56-65, 2004.

MELO, S.C.O.; GAIOTTO F.A.; CUPERTINO F.B.; CORRÊA, R.X. REIS, A.M.M.; GRATTAPAGLIA D. E BRONDANI, R.P.V. 2007. Microsatellite markers for **Caesalpinia echinata** Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conserv Genet**, 8:1269–1271.

MENDES, F. B. G. **Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil**. 2009. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP. 87p, 2009.

MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por marcadores microssatélites e caracteres quantitativos em duas populações naturais de *Myracrodunon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - ANACARDIACEAE (Syn: *Astronium urundeuva* FR Allemão Engle)**. Piracicaba, 1992. 153p. Tese (Doutorado) -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MORENO, M.A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP. 2009, 115p.

MYERS, N; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000.Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853-858.

NEGRELLE, R. R. B. **Vochysiaceae St. Hil. do Estado do Paraná, Brasil**. 1998. 142 f. Tese (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NEGRELLE, R. R. B.; MOROKAWA, R.; RIBAS, C. P. **Vochysia Aubl. do Estado do Paraná, Brasil**. Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, v. 29, n. 1, p. 29-38, 2007.

NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, v.70, p.3321-3323, 1973.

NG, K. K. S.; LEE, S. L.; TSUMURA, Y.; UENO, S.; NG, C. H.; LEE, C. T. Expressed sequence tag-simple sequence repeats isolated from *Shorea leprosula* 75 and their transferability to 36 species within the Dipterocarpaceae. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 393–398, 2009.

NUCCI, S.M.; AZEVEDO-FILHO, J.A.; COLOMBO, C.A.; PRIOLLI, R.H.G.; COELHO, R.M.; MATA, T.L. E ZUCCHI, M.I. 2008.Development and characterization of microsatellites markers from the macaw. **Molecular Ecology Resources**, 8: 224–226.

OLIVEIRA, P. E. **Biologia floral de *Salvertia convallariodora* (Vochysiaceae): uma espécie de cerrado polinizada por mariposas**. Revista Brasileira de Botânica 19: 49–53. 1996.

OLIVEIRA, P. E.; P. GIBBS. **Pollination biology and breeding systems of six *Vochysia* species (Vochysiaceae) in Central Brazil**. Journal of Tropical Ecology 10: 509–522. 1994.

- OLIVEIRA, P. E. **Reproductive biology, evolution and taxonomy of Vochysiaceae in Central Brazil.** p. 381–393. *In*: OWENS S. J.; RUDAL, P. J. (eds). *Reproductive Biology in Systematics, Conservation and Economic Botany*. Royal Botanic Gardens, Kew, 513 p. 1998.
- OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, W.; MELO, M.M.R.F. Structure of the tree and shrub component of the Atlantic rain forest, Peruibe, SP. **Acta Bot. Bras.**, v.15, n.3, p.391-412, 2001.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29 n. 2, p.294-307, 2006.
- OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.
- PAVANELLI, L. E.; ARAUJO, F. F. Parâmetros químicos e biológicos indicadores de qualidade de solo sob cultivo de braquiárias e soja no oeste paulista. **Revista Ceres**, v. 57, n.1, p. 118-124. 2010.
- PILLON, C.N.; MIELNICZUK, J.; MARTIN NETO, L. **Dinâmica da matéria orgânica no ambiente.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 41 p.
- PINHEIRO, F.; PALMA-FILHA, C.; BARROS, R.; COZZOLINO, S. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. **Genetics and Molecular Biology**. n.2, v.32, p. 337-339, 2009.
- PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis Sprengel*) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 597-605, jul./set. 2004.
- PINTO, S.I.C.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.65, p.40-48, 2004.
- PINTO, C.B. & MARQUES, R. Aporte de nutrientes por frações da serapilheira em sucessão ecológica de um ecossistema da Floresta Atlântica. **Revista Floresta**, v.33, n.3, p.257-264, 2003.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; DOYLE, J.J.; McNICOL TINGEL, S.V.; RAFALSKI, A.J. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus soja revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. **Genetics**, Austin, v.144, n. 2, p. 793-803, 1996.
- PREVEDELLO, C.L. **Física do solo com problemas resolvidos.** Curitiba: Saleswarddiscovery, 1996. 446p.
- PREZOTTI, L. C.; GOMES, J. A.; DADALTO, G. G.; OLIVEIRA, J. A. **Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Espírito Santo – 5ª aproximação.** Vitória: SEEA/INCAPER/ CEDAGRO, 2007. 305p.

PRIMMER, C.R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, 3:445-449, 2000.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do Solo e Adubação: Acidez e Calagem**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. Piracicaba, SP. p. 343, 1991.

RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L.H.O.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio Branco, v.42, n.9, p.1291-1298, 2007.

REIS, C.A.F.; SOUZA, A.M.; MENDONÇA, E.G.; GONÇALVES, F.R.; MELO, R.M.G.; CARVALHO, D. Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Chusciaceae) em uma floresta paludosa. **Revista Árvore**. v.33,n.2,p.265-275, 2009.

RIBEIRO, M. T.; RAMOS, F. .N.; SANTOS, F. A. M. **Tree structure and richness in an Atlantic Forest fragment**: distance from anthropogenic and natural edges. *Revista Árvore*, v.33, n.6, p.1123-1132, 2009.

RIBEIRO, P. H. **Matéria orgânica e atributos químicos em solo de tabuleiros costeiros sob diferentes coberturas vegetais**. Jerônimo Monteiro, ES: UFES, 2011. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

RICKLI, H. C. **Propagação de Guaricica (*Vochysia bifalcata* Warm.) por sementes e estaquia caulinar**. 2012. 102 (Doutorado). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. Ed. Porto ALEGRE: ArtMed, 2006. 752p.

RITTER, L. M. O.; BAJAY, M. M.; MONTEIRO, M.; SOUZA, R. G. V. C.; MORENO, M. A.; KAGEYAMA, P. Y. **Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian cerrado**. *American journal of botany*, v 99(3), p. 97-98, 2012.

RODRIGUES, A. B. C.; SCARAMUZZA, W. L. M. P.; SCARAMUZZA, J. F.; ROCHA, F. Atributos químicos em solo sob floresta nativa e capoeira. **Uniciências**, v.14, n.1, p.23-38, 2010.

RODRIGUES, K.R. **Geoambientes e solos em ambientes altimontanos nos Parques Nacionais de Itatiaia e Caparaó-MG**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas apresentado a Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2011.

ROGALSKI, J.M.; BERKENBROCK, I.S.; REIS, A.; REIS, M.S. Sucessão e manutenção da diversidade biológica e da variabilidade genética: ferramentas básicas para a restauração ambiental. In: SOBRADO, 2003, **Anais**, 2003.

ROMANO, E. & BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas**, <http://www.uefs.br/disciplinas/bot859/extra.pdf> , (20 nov 2014).

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

SALUSTIO, P.; TARAZI, R.; MORO, G.; DEFAVARI, G.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. **Estrutura genética interna em uma população de pau terra na Estação Ecológica de Itirapina, SP**. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO 9; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS 2; Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2008. Disponível em: http://simposio.cpac.embrapa.br/simposio/trabalhos_pdf/00423_trab1_ap.pdf Acesso em: 10 Jan. 2015.

SALVADOR, J. T.; CARVALHO, T. C.; LUCCHESI, L. A. C. Relações cálcio e magnésio presentes no solo e teores foliares de macronutrientes. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 27-32, 2011.

SANTOS, M. L.; AFONSO, A. DE P.; OLIVEIRA, P. E. **Biologia floral de *Vochysia cinnamomea* Pohl (Vochysiaceae) em cerrados do Triângulo Mineiro, MG**. Revista Brasileira de Botânica 20: 127–132. 1997.

SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Metropole. 654p. 2008.

SCHEER, M.B.; CURCIO, G.R.; RODERJAN, C.V. Funcionalidades ambientais de solos altomontanos na Serra da Igreja, Paraná. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Viçosa, v. 35, p. 1113-1126, 2011.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers- Just a matter of fashion? **Nature Reviews: Genetics**, london, v.5, p. 63-69, 2004.

SCHOENHOLTZ, S.H.; VAN MIEGROET, H.; BURGER, J.A. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, Wageningen, v.138, p.335-356, 2000.

SCHUELLER, J.K. **O estudo da arte da agricultura de precisão nos EUA**. In: SIMPÓSIO SOBRE AGRICULTURA DE PRECISÃO, 2., Piracicaba, 2000. **Anais**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000. p.8-16.

SEBBENN, A.M. **Distribuição da variação genética de populações de Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) o. Ktze) por caracteres quantitativos e isoenzimas**. 2001. 210p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCovsky, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p. 127-143, dez. 2008.

SEITZ, R. A. **A regeneração natural na recuperação de áreas degradadas**. In: SIMPÓSIO SULAMERICANO, 1.; SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 2., 1994. Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: FUPEF, 1994. p. 103-110.

SENTERRE, B.; OBIANG, D. **Nouvelles découvertes à propos des *Vochysiaceae* africaines: *Erismadelphus* Mildbr. et *Korupodendron* Litt & Cheek**. Taxonomania 17: 3-18. 2005.

SEOANE, E.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M.S.; BAWA, K, e SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.17, n.1, p.25-43, 2005.

SHIMIZU, G. H. **Vochysiaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 149 f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SHIMIZU, G. H.; YAMAMOTO, K. **Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Vochysiaceae**. Bol. Bot. Univ. São Paulo, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 63-87, 2012.

SIA, E.A.; BUTLER, C.A.; DOMINSKA, M.; GREENWELL, P.; FOX, T.D.; PETES, T.D. Analyses of microsatellite mutation in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.97, p. 250-255, 2000.

SIBOV, S.T., SOUZA JR, C.L., GARCIA, A.A.F., GARCIA, A.F., SILVA, A.R., MANGOLIN, C.A., BENCHIMOL, L.L., et al. (2003) Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers . Map construction and localization of loci. **Hereditas**, 106: 96–106.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350p.

SILVA, R. D. **Indicadores de recuperação ambiental em diferentes coberturas florestais, Alegre – ES**. Jerônimo Monteiro, ES: UFES, 2012. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

SIMAS, F.N.B., SCHAEFER, C.E.G.R., FERNANDES FILHO, E.I., CHAGAS, A.C., BRANDÃO, P.C. Chemistry, mineralogy and micropedology of highland soils on crystalline rocks of the Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. **Geoderma**, Amsterdam n. 125, p. 187-201, 2005.

SKORUPA, A.L.A; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N.; SILVA, C.P.C; SCOLFORO, J.R.S.; MARQUES, J.J.G.S.M. Propriedades de solos sob vegetação nativa em Minas Gerais:

distribuição por fitofisionomia, hidrografia e variabilidade espacial. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Viçosa, v. 36, p. 11-22, 2012.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v. 89, p. 457-462, 1995.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **The comparison of dendrograms by objective methods**. *Taxon*. v.11, p.33-40, 1962.

SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S.A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R.F. et al., (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 205-274.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. Estrutura genética de populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 70-79, jun. 2009.

SOUZA, A.M.. **Estrutura genética de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. na bacia do alto Rio Grande**. Tese (doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Lavras - MG, 2010.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. Nova Odessa, São Paulo, Brasil, 2012.

SPENCER, C. C.; NEIGEL, J. E.; LEBERG, P. L. Experimental evolution of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1517-1528, 2000.

STAFLEU, F. A. **A monograph of Vochysiaceae. I. *Salvertia* and *Vochysia***. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais* 41: 397-540. 1948.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repairs. **Nature**, London, v.365, p. 274-276, 1993.

SYTSMA, K. J.; LITT, A. ZJHRA, M. L.; PIRES, J. C.; NEPOKROEFF, M.; CONTI, E.; WALKER, J.; WILSON, P. G. **Clades, clocks, and continents: historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and relatives in the southern hemisphere**. *International Journal of Plant Sciences* 165 (suppl. 4): S85-S105. 2004.

TARNOWSKI, C.G. **Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microsatélites (SSRS) para *cedrela lilloi* c. de Candolle**. Dissertação (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TELLES, M.P.C.; SILVA, R.S.M.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; DINIZ FILHO, J.A.F. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões

edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.11,p. 1387-1394, nov. 2001.

TROEH, F.R.; THOMPSON, L.M. **Solos e fertilidade do solo**, São Paulo: Editora Andrei, 2007. p.63.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**. n. 1, v. 23, 2005.

VASCONCELOS, P.M.G. **Diversidade genética de *Myrciaria floribunda* (West ex Willdenow) Berg (Cambuí) em paisagem fragmentada da Serra da Mantiqueira, MG**. Dissertação (mestrado em Recurso Florestais). Universidade Federal de São Paulo. Piracicaba, 2011.

VERON, V.; CARON, H. & DEGEN, B. 2006. Gene flow and mating system of the tropical tree *Sextonia rubra*. **Silvae Genetica**, 54(6): 275-280.

VIANNA, M. C. **O gênero *Vochysia* Aublet (Vochysiaceae) no Estado do Rio de Janeiro**. Rodriguésia 55: 237-323. 1980.

VIANA, V.M.; PINEIRO, L.A.F.V. **Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais**. Série Técnica IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, 2009.

VIEGAS, M.P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica**. 2009. 68f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

VITOUSEK, P. M.; SANFORD, R. L. Nutrient Cycling in Moist Tropical Forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, p. 137-167, 1986.

WENIGER, B. et al. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytother Res**, v. 19, n. 1, p. 75-7, Jan 2005.

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.6, p. 851-860, 1997.

WHITE, G.M.; BOSGIER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population so *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v.8, p. 1899-1909, 1999.

WRIGHT, S. **The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating**. Evolution 19: 395-42. 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Vol. 4: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago. 1978.

YEH F.C.; BOYLE T.J.B. **Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits**. Belgian Journal of Botany 129: 156-157. 1997.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.11, n.10, p.413-418, 2001.

APÊNDICE 1

Apêndice 1- Descrição dos 28 indivíduos de *V. bifalcata*.

Populações	Nº da Matriz	Altura (m)	*DAP (cm)	Posição na Paisagem
I	Voc 1	22,0	46,7	Fundo de Vale
	Voc 2	18,0	46,3	Fundo de Vale
	Voc 3	15,0	30,5	Terço Médio
	Voc 4	22,0	66,5	Fundo de Vale
	Voc 5	16,0	38,3	Terço Médio
	Voc 6	12,0	24,3	Terço Médio
	Voc 7	22,0	46,5	Fundo de Vale
	Voc 8	16,0	53,0	Terço Médio
	Voc 9	27,0	76,0	Fundo de Vale
	Voc 10	25,0	67,0	Fundo de Vale
	Voc 11	25,0	85,0	Terço Médio
	Voc 12	28,0	72,4	Fundo de Vale
	Voc 13	25,0	60,0	Fundo de Vale
	Voc 14	18,0	78,0	Fundo de Vale
	Voc 15	16,0	27,0	Terço Médio
Média Pop I	-	20,4	63,7	-
II	Voc 16	28,0	96,0	Fundo de Vale
	Voc 17	35,0	116,0	Terço Médio
	Voc 18	30,0	82,0	Terço Médio
	Voc 19	28,0	62,0	Terço Médio
	Voc 20	25,0	128,0	Terço Médio
	Voc 21	18,0	48,0	Fundo de Vale
	Voc 22	24,0	67,0	Terço Médio
	Voc 23	25,0	80,0	Terço Médio
	Voc 24	28,0	90,0	Fundo de Vale
	Voc 25	28,0	63,0	Fundo de Vale
	Voc 26	25,0	45,0	Terço Médio
	Voc 27	30,0	76,0	Fundo de Vale
	Voc 28	14,0	29,0	Terço Médio
Média Pop II	-	26,0	75,5	-
Média Geral (Pop I + Pop II)	-	22,1	64,2	-

Fonte: Autora

*(DAP= Diâmetro a altura do peito).